

Выявление абзимов с пенициллиназной активностью в сыворотке крови больных шигеллёзами

И. В. Жильцов, В. М. Семёнов, И. И. Генералов

Витебский государственный медицинский университет, Беларусь

Detecting of abzymes with β -lactamase-like activity in blood serum of patients ill with shigellosis

I. V. Zhylytsou, V. M. Semenov, I. I. Generalov

Vitebsk State Medical University, Belarus

Аннотация

Нами изучено 67 препаратов IgG, выделенных из сыворотки крови больных шигеллёзами. Обнаружено, что $33,82 \pm 5,74\%$ изученных препаратов IgG обладают β -лактамазной активностью. Способность абзимов гидролизовать антибиотики β -лактамного ряда полностью подавляется при добавлении к пробам раствора клавулановой кислоты. Показано, что наличие β -лактамазной активности в пробах иммуноглобулинов достоверно ассоциировано с: возрастом больных шигеллёзами (прямая корреляция), частотой стула в первую неделю заболевания (прямая корреляция) и наличием макроскопических количеств крови в стуле (прямая корреляция). Последняя зависимость наблюдалась в группе больных шигеллёзом Флекснера. Следовательно, в крови больных шигеллёзами обнаруживаются поликлональные IgG, проявляющие пенициллиназную активность и способные непосредственно разрушать введённые антибиотики.

Ключевые слова

Абзимы, пенициллиназная активность, шигеллёз, β -лактамы, клавулановая кислота.

Хорошо известна антибиотикоустойчивость микроорганизмов, ассоциированная со специфическими свойствами бактериальных клеток (особенности строения клеточной стенки, изменённые метаболические цепочки, варианты химического строения и пространственной организации белков и нуклеиновых кислот, выделение специфических ферментов, инактивирующих антибактериальные препараты) [1]. Гораздо реже вспоминают о том, что лекарственная устойчивость может быть обусловлена какими-либо свойствами макроорганизма, который, как известно, безразличен к введению антибиотиков. Такую антибиотикоустойчивость, непосредственно не связанную со свойствами возбудителя заболевания, можно назвать «био-

Summary

We have studied 67 preparations of IgG purified from the specimens of blood serum received from the same quantity of patients with shigellosis. It was revealed that $33,82 \pm 5,74\%$ of all preparations studied presents β -lactamase-like activity. The ability of abzymes to hydrolyse the antibacterial preparations of β -lactams group is fully inhibited by adding of clavulanic acid and reliably associated with: the age of patients with shigellosis (direct correlation), stools frequency for the first week of the disease (direct correlation), and the presence of macroscopic admixings of blood in stools (direct correlation, too). The last association was the most obvious in patients with Flexneri shigellosis. Thus, the blood of patients with shigellosis contains polyclonal IgG presenting penicillinase-like activity and capable of directly destruct the antibiotics injected.

Keywords

Abzymes, penicillinase-like-activity, β -lactams, clavulanic acid, shigellosis.

логической», в отличие от классической, «микробиологической». В нашей работе мы исследовали в первую очередь биологическую устойчивость к антибиотикам β -лактамного ряда, как к имеющим наибольшее распространение в клинике инфекционных болезней. Устойчивость бактерий к пенициллину и его дериватам связана с продукцией ими различных бета-лактамаз. Эти ферменты при развитии инфекции неизбежно проникают в кровь. Являясь сильными антигенами, они вызывают иммунизацию организма с образованием антител различной специфичности, что, согласно теории иммунологических сетей Эрне, делает возможным формирование каталитических антител по антиидиотипическому механизму [2, 3]. Возможность об-

разования *in vivo* антител к бета-лактамазам была доказана на примере больных с бронхолегочными поражениями, вызванными пенициллин-резистентной *Ps. aeruginosa* [4]. Формирующиеся антитела 2-го порядка в известной мере моделируют свойства первичных антигенов, то есть в данном случае — ферментов, разрушающих антибиотики. Соответственно, вполне вероятно появление антител, проявляющих, например, бета-лактамазную активность. Такие антитела, циркулируя в крови, сохраняют свойства исходного антигена, поддерживая напряжённость иммунитета, и, кроме того, могут разрушать антибиотики, введенные в организм, со скоростями, сравнимыми с бета-лактамазами бактерий. Возможность формирования таких антител в организме животных при иммунизации β -лактамазами была показана группой исследователей [5, 6, 7]. Обнаружение в крови больных антител с описанными свойствами могло бы прямо указывать на одну из причин низкой эффективности препаратов группы β -лактаманов в терапии таких больных. Кроме того, персистенция таких антител может привести к усилению «относительной» антибиотикоустойчивости микроорганизмов, так как способствует разрушению дополнительных количеств введенных антибиотиков. Возможно, именно это явление частично ответственно за появление антибиотикорезистентности *in vivo* при её отсутствии или незначительной выраженности *in vitro*. Наличие данных антител у больных соматическими и инфекционными заболеваниями, в частности, при шигеллёзах, никогда не изучалось.

Материалы и методы

Способ определения β -лактамазной активности антител

В основе методики определения бета-лактамазной активности антител лежит так называемая гидроксамовая реакция. Это — общегрупповая реакция на β -лактамы. При действии щелочного раствора гидроксилamina на пенициллины происходит реакция гидроксиламинолиза с образованием гидроксамовой кислоты, которая образует окрашенные соли (гидроксаматы) железа (III). Гидроксаматы образуются только в определённом интервале значений pH. Реакция малоспецифична, так как в неё вступают сложные эфиры, лактоны, амиды карбоновых кислот. В нашем случае в состав реакционной смеси, кроме β -лактамов, входят также белки (иммуноглобулины). Практика показала, что они также могут вступать в гидроксамовую реакцию, и, хотя их вклад в окрашивание реакционной смеси незначителен, это обусловило некоторые особенности постановки реакции. Тем не менее, в случае, если в реакционной системе имеются только (или в основном) β -лактамы, реакция обладает интересной и полезной особенностью, а именно: реакция гидроксиламинолиза протекает практически только по β -лактаманной связи (CO—N). Эта же связь является мишенью для действия классических β -лактамаз. Соответственно, данная реакция фиксирует только

такой распад β -лактамов, какой обусловлен и действием природных пенициллиназ бактерий. Свойство является ценным, так как позволяет фиксировать только «истинную» β -лактамазную активность (Рис. 1).

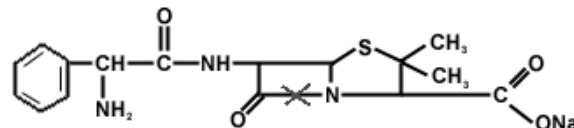


Рис. 1. Место распада β -лактаманной связи под воздействием пенициллиназ.

В качестве субстрата реакции использовался раствор химически чистого ампициллина тригидрата (1 мг/мл) в 0,02М ФБР, pH 7,4.

Работу методики иллюстрирует рис. 2.

Способ очистки иммуноглобулинов из сыворотки крови больных

Для исследования были использованы поликлональные иммуноглобулины (ИГ) субклассов G1, 2 и 4, полученные из сыворотки крови больных методом комбинированной очистки. При исследовании абзимной активности антител чистота получаемых препаратов абзимов имеет особо важное значение, так как содержание примесей ферментов даже в концентрации 0,001% приведет к значительному искажению результатов и их неправильной интерпретации [10].

Очистка проводилась в несколько стадий. Первые этапы (осаждение сыворотки крови риванолом, обработка надосадка активированным углем с последующей ДЕАЕ-хроматографией на матрицах Toyopearl 650 M или Молселект ДЕАЕ А50) осуществляли согласно рекомендациям [11]. Затем проводили аффинную хроматографию полученного материала на агарозе, конъюгированной с протеином А золотистого стафилококка. Элюцию связавшихся IgG проводили 0,1М глицин-HCl буфером, pH 2,8. Далее иммуноглобулины выделяли переосаждением в 40% растворе сульфата аммония и диализовали против 0,15М (физиологического) раствора NaCl. Концентрацию IgG в препаратах определяли с помощью спектрофотометрии на 280 нм, использован коэффициент пересчёта 1,45. Контроль чистоты ИГ проводили с помощью электрофореза в 10% и градиентном 4-20% полиакриламидном геле в присутствии 1% додецилсульфата натрия в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях по общепринятым методикам [9] (Рис. 3).

Опыты проводились с антителами, выделенными из сыворотки крови 67 больных острой дизентерией (Флекснера, Зонне, а также установленной по клиническим признакам).

Результаты и обсуждение

Бета-лактамазная активность антител наблюдалась в 33,82±5,74% всех проанализированных случаев. Выраженность каталитической активности колебалась

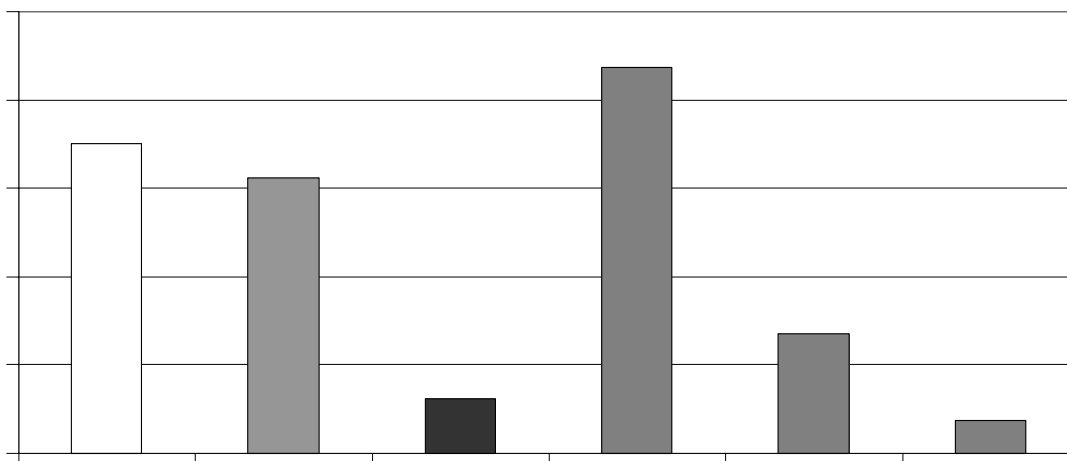


Рис. 2. Результаты выполнения гидроксамовой реакции в различных условиях (тестирование методики).

- 1 – ОП (после обработки, замер при длине волны 540 нм) пробы, содержащей 0,5 мг ампициллина тригидрата;
- 2 – ОП такой же пробы после кратковременного кипячения (убыль порядка 10%);
- 3 – ОП такой же пробы, нагретой до 100 °С с добавлением 1N HCl;
- 4 – ОП пробы, содержащей 0,5 мг ампициллина тригидрата и 0,5 мг иммуноглобулинов;
- 5 – ОП пробы, содержащей только 0,5 мг иммуноглобулинов;
- 6 – ОП пробы, содержащей 0,5 мг ампициллина тригидрата, после добавления 5 тыс ЕД пенициллиназы, время инкубации 15 минут).

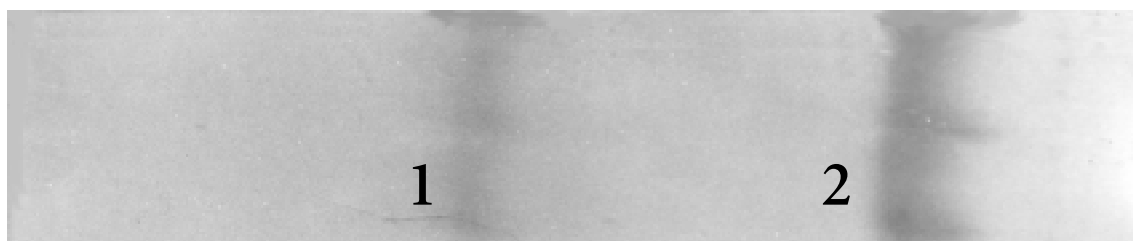


Рис. 3. Результат электрофореза препаратов иммуноглобулинов G, полученных комбинированным методом.

Условия электрофореза: 10% ПАА-гель, окраска Кумасси R250, диссоциирующие условия (лизирующий буфер содержит 1% додецилсульфат натрия), продолжительность экспозиции 3,5 часа, сила тока 25-30 мА.

1 — легкие цепи IgG; 2 — тяжелые цепи IgG

от 3 до 196% превышения уровня распада выбранного для анализа антибиотика (в данном случае химически чистого ампициллина тригидрата) над контрольными величинами (уровнем самораспада ампициллина за время инкубации), что примерно соответствует активности $8,4 \times 10^{-3} \dots 8,35 \times 10^{-2}$ ЕД пенициллиназы при сроке инкубации 1 сутки. Средний уровень лактамазной активности составил $41,96 \pm 10,29\%$ превышения над контролем (уровнем самораспада).

Предположительно, присутствие в крови некоторых больных шигеллёзами каталитических антител, проявляющих β -лактамазную активность, может приводить к клинической неэффективности препаратов из группы β -лактамов (в частности, цефалоспоринов 3 и 4 поколения), что наиболее существенно в группе детей до 12 лет, у которых эти антибиотики являются препаратами выбора для лечения шигеллёзов.

При статистическом анализе наблюдались следующие корреляционные зависимости:

1. Слабая положительная корреляция между выраженностью лактамазной активности антител и возрастом больных ($K=0,283$ в общей группе, $K=0,96$ в группе больных шигеллёзом Зонне, $p<0,01$);
2. Положительная корреляция средней силы между уровнем лактамазной активности и частотой стула на 1-4 сутки заболевания ($K=0,29\dots0,59$ в общей группе, $K=0,77$ в группе больных шигеллёзом Флекснера, $p<0,01$);
3. Положительная корреляция средней силы между уровнем лактамазной активности и наличием макроскопических количеств крови в стуле ($K=0,94$ в группе больных шигеллёзом Флекснера, $p<0,01$).

В этой связи можно предположить, что β -лактамазы шигелл каким-либо образом попадают в кровь (вероятно, при массивной деструкции кишечного эпителия). Соответственно, чем выраженнее деструктивный процесс в кишечнике, тем: а) чаще стул, б) больше лактамаз поступает в кровоток, обуславливая образование к ним антител и анти-антител второго порядка. Следует заметить, что шигеллы Флекснера более склонны к формированию тяжело протекающего заболевания с массивным деструктивным процессом, а указанная связь обнаружена именно у больных шигеллёзом Флекснера.

Проведен успешный эксперимент по ингибированию бета-лактамазной активности антител раствором клавулановой кислоты. Для этого были отобраны три пробы антител, показавшие достаточно высокую лактамазную активность. Был использован раствор клавуланата 1 мг/мл (то есть в концентрации заведомо избыточной). До добавления в реакционную смесь клавулановой кислоты во всех трёх испытуемых пробах имелась отчётливая и

статистически достоверная ($p<0,01$) пенициллиназная активность, с превышением уровня самораспада субстрата в контрольных пробах на 49,7-14,2%. После добавления в пробы раствора клавулановой кислоты (итоговая концентрация в пробе 100 мкг/мл) активность во всех трёх пробах упала ниже уровня самораспада в контроле на 27,4-8,4%. Собственно, так же проявляется действие клавулановой кислоты на настоящие β -лактамазы. Данное явление косвенно подтверждает предположение, что β -лактамазная активность поликлональных IgG обусловлена наличием на антителах так или иначе организованного активного центра наподобие такового у фермента. Этот активный центр конкурентно ингибируется клавулановой кислотой.

Заключение

1. В сыворотке крови 33,82% больных шигеллёзами обнаруживаются поликлональные иммуноглобулины класса G, обладающие пенициллиназной активностью.
2. Наличие у абзимов β -лактамазной активности прямо коррелирует с возрастом больных, частотой стула в ранние сроки заболевания (1-4 сутки пребывания в стационаре), а также с наличием макроскопических примесей крови в стуле в эти же сроки (в группе больных шигеллёзом Флекснера).
3. Обнаружена достаточно отчётливая связь β -лактамазной активности антител и возраста больных. Указанная связь может служить подтверждением того, что β -лактамазная активность антител проявляется по мере учащения контакта организма с бета-лактамазами бактерий, вероятность чего с возрастом увеличивается;
4. Выявлена отчётливая связь β -лактамазной активности антител с частотой стула и наличием макроскопических примесей крови в стуле при дизентерии Флекснера.

Литература

1. Антибактериальная терапия Под ред. Страчунского Л.С., Белоусова Ю.Б., Козлова С.Н. М: Полимаг, 2000.
2. Schultz P.G., Lerner R.A., Benkovic S.J. Catalytic antibodies Chem. and Eng. News. 1990; 22: 26-40.
3. Shokat K.M., Schultz P.G. Catalytic antibodies Annu. Rev. Immunol. 1990; Vol.8: 335-363.
4. Giwercman B., Rasmussen J.W., Cioufu O. et al. Antibodies against chromosomal beta-lactamase. Antimicrob. Agents. Chemother. 1994; 38(10): 2306-2310.
5. Avalle B., Thomas D., Friboulet A. Functional mimicry: elicitation of a monoclonal anti-idiotypic antibody hydrolyzing beta-lactams. FASEB J. 1998; 12(11): 1055-1060.
6. Avalle B., Debat H., Friboulet A., Thomas D. Catalytic mechanism of an abzyme displaying a beta-lactamase-like activity. Appl. Biochem. Biotechnol. 2000; 83 (1-3): 163-169.
7. Debat H., Avalle B., Chose O. et al. Overpassing an

aberrant V (kappa) gene to sequence an anti-idiotypic abzyme with (beta)-lactamase-like activity that could have a linkage with autoimmune diseases. FASEB J. 2001; 15(3): 815-822.

8. Жильцов И.В., Дмитраченко Т.И., Троцкий С.В., Семенов В.М. К вопросу о патогенезе антибиотикоустойчивости штаммов шигелл Флекснера 2а. Актуальные вопросы теоретической и практической медицины. 2000; 138-139.

9. Петяев И.М., Кульберг А.Я. Ферментативные свойства антител и клеточных рецепторов. Иммунология. 1988; 5: 12-14.

10. Shokat K.M., Schultz P.G. Catalytic antibodies Annu. Rev. Immunol. 1990; Vol.8: 335-363.

11. Иммунологические методы Под ред. Г.Фримеля. Пер. с нем. - М.: «Мир», 1987.