

Бета-лактамазная активность белков человеческой крови: новый взгляд на патогенез антибиотикоустойчивости

И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, Е.Н. Полешук

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

Beta-lactamase-like activity of human blood proteins: the fresh look at the pathogenesis of antibiotics resistance

I.V. Zhylytsou, I.S. Veramei, V.M. Semenov, I.I. Generalov, E.N. Poleshuk

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Разрушение бета-лактамных антибиотиков, помимо бета-лактамаз бактерий, может осуществляться компонентами цельной крови. Наличие в крови больных факторов, эффективно разрушающих бета-лактамы антибиотиков, может быть причиной низкой эффективности данных антибактериальных препаратов в лечении таких больных. Целью нашей работы было выявление и оценка уровня собственной бета-лактамазной активности плазмы крови как больных, так и здоровых лиц. Для определения бета-лактамазной активности плазмы крови использовался модифицированный нами неокупроиновый метод. В качестве модельных антибиотиков были использованы ампициллин и бензилпенициллин. Были обследованы 30 человек - 10 больных рецидивирующей рожей, 10 больных внегоспитальной пневмонией и 10 здоровых подростков-спортсменов (соотношение мужчин и женщин 1:1 во всех подгруппах). Была выявлена значительная бета-лактамазная активность плазмы крови как больных, так и здоровых лиц: за время инкубации (20 минут) распалась большая часть от количества обоих модельных антибиотиков, добавленных в пробы (до 69% от внесенного количества ампициллина, до 86% от внесенного количества бензилпенициллина). Во всех изученных подгруппах уровень распада модельных антибиотиков достоверно ($p < 0,00001$) превышал уровень их самораспада в контрольных пробах. Таким образом, не вызывает сомнения, что в крови как больных, так и здоровых лиц имеется фактор (или несколько), резко усиливающий специфический (по бета-лактамной связи) гидролиз бета-лактамных антибиотиков.

Ключевые слова

«Биологическая» антибиотикорезистентность, бета-лактамазная активность, белки человеческой крови, инфекционные болезни, бета-лактамные антибиотики.

Summary

The antibiotics of beta-lactam group can in theory be cleaved by some components of the whole blood, and, perhaps, plasma and blood serum besides bacterial beta-lactamases. Determination of factors capable of efficient cleavage of beta-lactams within patient's blood could directly indicate one of the possible reasons of low efficacy of the above antibacterials in treatment of the such patients. Thus, the aim of our work was identification of proper beta-lactamase-like activity of blood plasma of both ill and healthy persons and evaluation of its level. We used self-modified neocuproine technique for determination of beta-lactamase-like activity of blood plasma. Ampicillin and benzylpenicillin were used as model antibiotics. We examined 30 persons - 10 patients with recurrent erysipelas, 10 - with pneumonia, and 10 healthy teenager sportsmen (ratio of men to women was 1:1 in each subgroup). Finally, significant beta-lactamase-like activity was revealed in blood plasma of both ill and healthy persons: both model antibiotics what have been added to plasma samples were mostly hydrolyzed for the time of incubation (20 minutes, 37°C) - up to 69% of total amount of ampicillin and up to 86% of total amount of benzylpenicillin. The level of destruction of model antibiotics in all subgroups was reliably higher than the level of self-destruction of the same antibiotics in control samples ($p < 0,00001$). Thus, there is no doubts that some factor (or several factors) exists in blood of both patients and healthy persons what can dramatically increase the specific (on beta-lactam bond) hydrolysis of beta-lactam antibiotics.

Key words

«Biological» antibiotics resistance, beta-lactamase activity, blood proteins, infectious diseases, antibiotics of beta-lactam group.

Основным механизмом устойчивости бактерий к бета-лактамам является синтез разнообразных бета-лактамаз. В то же время, макроорганизм не безразличен к введению антибиотиков. В частности, в наших предыдущих работах было показано, что в крови у 33,82% больных шигеллезом определяются поликлональные антитела субклассов G1, 2 и 4, обладающие бета-лактамазной активностью (причем у некоторых препаратов иммуноглобулинов данная активность оказалась довольно значительной) [1]. Формирование в организме таких антител, обладающих каталитической активностью («абзимов») объясняется исходя из теории иммунологических сетей Ерне [2].

В целом необходимо отметить, что метаболизм бета-лактамов антибиотиков в организме изучен недостаточно, причем все крупные зарубежные исследования в этом направлении были свернуты к началу 90-х гг. прошлого века, сменившись узкоприкладными, сугубо специализированными научными работами. Так, известно, что введенные парентерально бета-лактамы связываются с различными белками крови (от 19 до 96% введенного препарата, в зависимости от его химических особенностей), преимущественно – с альбуминами [3]. В дальнейшем антибиотик взаимодействует с пенициллин-связывающими белками (ПСБ) бактерий, из которых наиболее известна D-аланин-карбоксипептидаза (всего число известных ПСБ у различных бактерий достигает 12). Бета-лактамы препараты являются аналогами переходного состояния основного субстрата для данного фермента – ацил-D-аланил-D-аланиновых окончаний главной составляющей бактериальной стенки – мурамилпептида (пептидогликана); они вступают в конкуренцию с D-аланил-D-аланиновыми остатками за активный центр D-аланин-карбоксипептидазы; в процессе взаимодействия бета-лактама связь антибиотика разрывается ферментом и ковалентно связывается с остатком цистеина (по другим данным, с остатком серина [4]), образуя тиоэфир. Получившийся в результате комплекс «фермент-пенициллоиловая кислота» стабилен (в отличие от комплекса «фермент-субстрат»), вследствие чего происходит необратимое ингибирование фермента (т.е. бета-лактама – это т.н. «субстрат-убийца» - killing substrate) [5]. При этом происходит наруше-

ние формирования перекрестных связей молекул пептидогликана между собой, клеточная стенка бактерий получается рыхлой и перестает предохранять бактерий от осмотического лизиса. Показано, в частности, что в гиперосмолярной среде лизиса бактерий, подвергшихся действию пенициллина, не происходит; кроме того, бета-лактамы эффективно воздействуют только на активно размножающиеся бактерии, не влияя на покоящиеся [5]. Остатки антибиотика, не связавшиеся бактериальной клеткой, достаточно быстро выводятся почками (так, период полувыведения бензилпенициллина – 0,5-1 час с момента введения) [6].

При внешней убедительности приведенные данные неполны. В частности, доподлинно неизвестно, с какими белками в плазме крови связываются бета-лактамы, насколько прочна данная связь, происходят ли химические либо конформационные изменения молекул антибиотика в процессе транспортировки, какая именно фракция антибиотика (связанная либо несвязанная) имеет большее бактерицидное значение. В частности, имеются косвенные данные о том, что лишь малая часть введенных извне бета-лактамов достигает ПСБ бактерий. Так, по данным различных исследователей, грам-положительные микроорганизмы связывают от 4 до 15 нмоль пенициллина на 1 грамм сухого веса бактерий (от 100 до 10.000 молекул пенициллина на бактерию, в среднем 1000-4000 молекул); грам-отрицательные микроорганизмы связывают в среднем в 5-10 раз меньше [5]. Таким образом, бета-лактамы вводятся в организм с огромным избытком, вероятно, необходимым для покрытия естественной убыли антибиотиков в процессе транспортировки и распределения в тканях.

Известно, что за разрушение бета-лактамов антибиотиков отвечают бактериальные ферменты из группы бета-лактамаз, причем в человеческом организме аналоги данного фермента отсутствуют [7]. Тем не менее, имеются публикации, утверждающие, что гемолизированная кровь может разрушать 3-ацетоксиметил-цефалоспорины (цефалотин, цефотаксим) посредством деацетиляции 3-ацетоксиметильной группы; при этом плазма и сыворотка крови, не содержащие продуктов лизиса эритроцитов, такой активностью не обладают. Следует отметить, что в данном случае бета-лактама связь не разрушается,

из-за чего цефалоспорины, не содержащие 3-ацетоксиметильной группы (цефалоридин, цефалексин, цефамандол, цефазолин), не утрачивают активности в присутствии гемолизированной крови [8]. Данное наблюдение показывает, что антибиотики бета-лактаманного ряда в принципе могут разрушаться какими-либо компонентами цельной крови, и, возможно плазмы или сыворотки крови, кроме бета-лактамаз (в частности, каталитическими антителами, о чем говорилось выше) [1]. Обнаружение в крови больных факторов (возможно, нескольких), эффективно разрушающих бета-лактаманные антибиотики, может прямо указывать на одну из причин низкой эффективности указанных антибиотиков в лечении таких больных. Возможно, именно инактивация антибиотиков макроорганизмом лежит в основе феномена появления антибиотикорезистентности *in vivo* при её отсутствии или незначительной выраженности *in vitro*, неоднократно наблюдавшегося клиницистами. Ранее механизмы и проявления «биологической» антибиотикорезистентности не изучались.

Соответственно, целью нашей работы было выявление и оценка уровня собственной бета-лактамазной активности плазмы крови как больных, так и здоровых лиц, а также, по возможности, установление белковых (или иной природы) субстратов, ответственных за проявление данной активности (если таковая обнаружится).

Материал и методы

Для изучения β -лактамазной реактивности макроорганизма оказалась наиболее применима спектрофотометрическая методика на основе реакции комплексообразования ионов меди, неокупроина и гидролизованной β -лактаманной связи различных производных 6-аминопенициллановой кислоты, образующей окрашенный продукт желтого цвета (т.н. неокупроиновый метод). Применение неокупроинового метода представляется достаточно перспективным, поскольку с его помощью избирательно выявляется гидролизованная в-лактаманная связь различных антибиотиков бета-лактаманного ряда [9]. Ранее нами производилась сравнительная оценка различных методов выявления бета-лактамазной активности, в результате которой неокупроиновый метод был признан оптимальным [10].

Все используемые реагенты имели квалификацию не ниже ч.д.а. Спектры поглощения и измерение оптических плотностей проводили на спектрофлуориметре SOLAR-CM2203 (гос. рег. № РБ 03 11 2864 06) в режиме спектрофотометрии. В эксперименте в качестве субстратов использовали бензилпенициллина натриевую соль и ампициллин.

Модельный раствор антибиотика смешивали с исследуемой сывороткой крови в соотношении 1:1 и помещали в термостат ($t=37^{\circ}\text{C}$) на 20 минут. Спустя указанное время к тест-объектам прибавляли раствор хлорной кислоты для осаждения белковой матрицы. В качестве контроля использовали модельные растворы бензилпенициллина и ампициллина, разведенные дистиллированной водой в соотношении 1:1 с добавлением хлорной кислоты. Все тест-объекты встряхивали на вортексе в течение 2 минут и центрифугировали при 3000 об/мин 10 минут, после чего отбирали надосадочную жидкость. Учитывая вероятность потерь антибиотика с белковым осадком, был введен дополнительный контроль. Для этого предварительно полностью гидролизованные кипячением с гидроокисью натрия антибиотики вносили в эквивалентных количествах в испытуемые сыворотки и далее проводили депротеинизацию, как указано выше. Далее к исследуемым растворам прибавляли ацетатный буфер ($\text{pH}=4,75$), неокупроиновый реагент и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут до развития стабильной желтой окраски. Спустя вышеуказанное время измеряли оптическую плотность образовавшихся комплексов при 454,5 нм.

Дизайн собственно исследования - срезное (cross-sectional; изучаемый признак оценивался одновременно и однократно во всех исследуемых подгруппах), основанное на наблюдении (observational, т.е. никаких тестовых медицинских вмешательств, в том числе смены и модификации проводимой терапии, не производилось). Одномоментно были получены и проанализированы сыворотки крови 30 человек - 10 больных рецидивирующей рожей, 10 больных пневмонией и 10 здоровых военнослужащих срочной службы. На момент выполнения исследования все больные находились на стационарном лечении в различных отделениях Витебской областной инфекционной клинической больницы, а военнослужащие проходили плановое обследование на

предмет носительства *S. trachomatis* на базе того же стационара. Средний возраст больных составил 49,6 лет (95% CI: 33,14-62,28; min 10, max 80), средний возраст военнослужащих - 18,5 лет (95% CI: 17,53-19,47; min 17, max 21). Во всех 3 подгруппах было по 5 женщин и 5 мужчин, т.е. общее соотношение женщин и мужчин как во всей анализируемой группе, так и в подгруппах составило 1:1.

Статистический анализ результатов исследования был выполнен с использованием аналитического пакета Statistica 6.0 (для проверки нормальности распределения изучаемых признаков применялся тест Колмогорова-Смирнова, для выявления корреляционных взаимосвязей - ранговый анализ Спирмена (Spearman), для проверки достоверности различий изучаемых признаков в независимых выборках - U-тест Манна-Уитни (Mann-Whitney)).

Результаты исследования

При проверке нормальности распределения выяснилось, что распределение всех изучаемых признаков нормальным не являлось; преобладали смещенные типы распределения. Соответственно, для дальнейшего статистического анализа полученных результатов использовались только непараметрические методы анализа (см. выше).

В ходе исследования была выявлена значительная бета-лактамазная активность плазмы крови как больных, так и здоровых лиц: за время инкубации (20 минут) распадались большая часть от количества обоих модельных антибиотиков (бензилпенициллина и ампициллина), добавленных в пробы. Следует отметить, что анализировались образцы плазмы крови без малейших внешних признаков гемолиза.

Средний уровень распада антибиотиков через 20 мин инкубации при 37°C составил:

1. Во всей группе:

60,67% от общего количества добавленного к плазме крови ампициллина (95% CI: 54,59-66,77),

79,69% от общего количества добавленного к плазме крови бензилпенициллина (95% CI: 74,53-84,84).

2. В подгруппе больных рецидивирующей рожей:

58,51% от общего количества добавленного к плазме крови ампициллина (95% CI: 45,40-71,63),

76,22% от общего количества добавленного к плазме крови бензилпенициллина (95% CI: 63,68-88,75).

3. В подгруппе больных пневмонией:

54,65% от общего количества добавленного к плазме крови ампициллина (95% CI: 42,76-66,54),

76,73% от общего количества добавленного к плазме крови бензилпенициллина (95% CI: 69,62-83,85).

4. В подгруппе здоровых военнослужащих:

68,86% от общего количества добавленного к плазме крови ампициллина (95% CI: 60,86-76,87),

86,1% от общего количества добавленного к плазме крови бензилпенициллина (95% CI: 77,66-94,55).

Данные результаты иллюстрируются рисунком.

Во всех изученных подгруппах уровень распада модельных антибиотиков достоверно превышал уровень их самораспада в контрольных пробах (M-W U-test, $p < 0,000001$).

Уровень распада бензилпенициллина во всех подгруппах оказался достоверно выше уровня распада ампициллина (M-W U-test, $p < 0,000001$).

При анализе достоверности межгрупповых различий было показано, что уровень распада ампициллина был достоверно выше в подгруппе военнослужащих (M-W U-test, $p = 0,039$); уровень распада бензилпенициллина в группе военнослужащих также оказался выше, чем у больных рецидивирующей рожей и пневмонией, но достоверность выявленных различий была существенно ниже (M-W U-test, $p = 0,10$).

В подгруппах больных рецидивирующей рожей и пневмонией уровни распада как ампициллина, так и бензилпенициллина достоверно не различались (M-W U-test, $p = 0,50$ и $0,62$, соответственно).

Значимых корреляционных взаимосвязей между наблюдаемым уровнем пенициллиназной активности крови, возрастом и полом больных выявлено не было.

К сожалению, малый размер группы и ограниченная реагентная база данного эксперимента не позволили провести анализ кинетики реакции, оценить влияние ингибиторов бактериальных пенициллиназ на уровень каталитической активности, а также уточнить зависимость уровня бета-лактамазной активности крови от возраста и пола исследуемых лиц. Таким образом, полученные нами результаты носят сугубо предварительный характер.

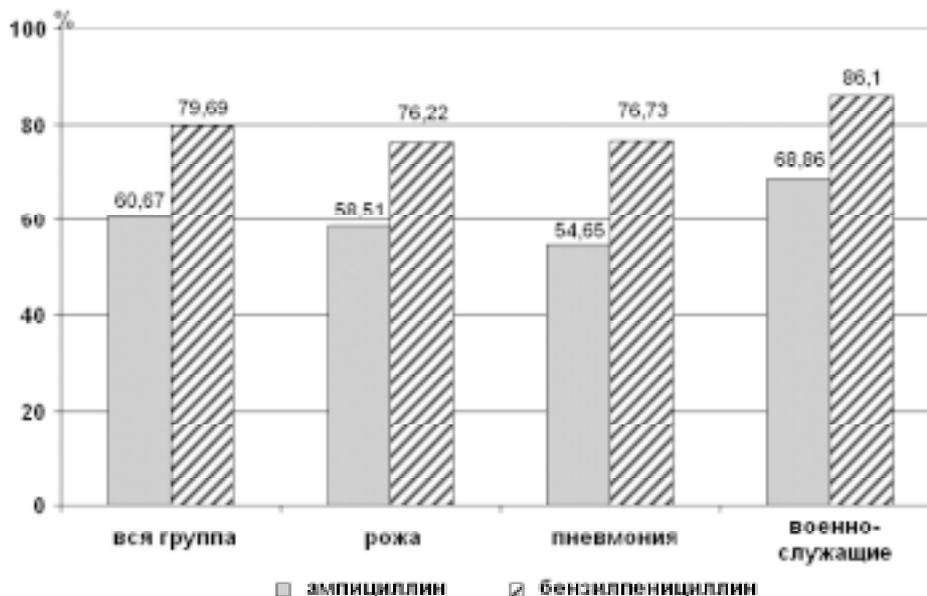


Рис. Уровень распада бета-лактамных антибиотиков (ампициллина и бензилпенициллина) при добавлении их к плазме крови в условиях инкубации (20 минут при 37°C).

Заключение

Не вызывает сомнения, что в крови как больных, так и здоровых лиц имеется некий фактор (или несколько), резко усиливающий специфический (по бета-лактамной связи) гидролиз бета-лактамных антибиотиков. Данный фактор, вероятнее всего, не имеет отношения к продуктам распада гемоглобина, т.к. в исследуемых образцах плазмы крови не было признаков гемолиза. Вполне допустимо предположение, что наблюдаемая значительная бета-лактамазная активность плазмы крови объясняется побочным (неспецифическим) действием каких-либо ферментов крови с основной протеолитической или эстеразной активностью (например, компонентов системы фибринолиза либо комплемента).

Выявленный феномен имеет большое клиническое значение, т.к., будучи подтвержденным, может объяснить многие из наблюдаемых случаев неэффективности антибактериального препарата *in vivo* при его доказанной микробиологической эффективности *in vitro*. Кроме того, распоз-

нав фактор (или факторы), ответственный за аномально высокий распад бета-лактамов в крови, и разработав эффективную методику его ингибирования, можно резко повысить «относительную» эффективность бета-лактамов, и, соответственно, многократно снизить их терапевтические дозировки, что приведет в итоге к существенной экономии средств, выделяемых на этиотропную терапию. В случае же выявления высокой бета-лактамазной активности крови возможно изменение проводимой конкретному больному эмпирической терапии - назначение какого-либо из ингибитор-защищенных бета-лактамов либо антибактериального препарата из других фармакологических групп; своевременная коррекция проводимой этиотропной терапии позволит ускорить выздоровление и сократить продолжительность госпитализации больного.

Несомненно, необходимы дальнейшие углубленные лабораторные и клинические исследования обнаруженного феномена, который представляет существенный интерес для клиники инфекционных болезней.

Литература

1. Жильцов И.В., Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Генералов И.И. Особенности «биологической» антибиотикоустойчивости при шигеллезах: выявление *in vivo* поликлональных IgG, обладающих пенициллин-назной активностью. Медицинская панорама 2006; №5 (62): 46-48.
2. Jerne N.K. Towards a network theory of the immune system. *Ann.Immunol. (Inst.Pasteur)* 1974; Vol.125; №1-2: 373-389.
3. Shirley M. Palmer, Lena S. Kang, Diane M. Cappelletty, Michael J. Rybak Bactericidal Killing Activities of Cefepime, Ceftazidime, Cefotaxime, and Ceftriaxone against *Staphylococcus aureus* and β -Lactamase-Producing Strains of *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* in an In Vitro Infection Model. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 1995; Vol. 39; №8: 1764-1771.
4. Rogers R. Yocum, David J. Waxman, James R. Rasmussen, Jack L. Strominger. Mechanism of penicillin action: Penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases (B-lactam/ peptidoglycan/ membrane enzyme/ penicillinase/ acyl enzyme). *Biochemistry* 1979; Vol. 76; № 6: 2730-2734.
5. Peter M. Blumberg, Jack L. Strominger. Interaction of Penicillin with the Bacterial Cell: Penicillin-Binding Proteins and Penicillin-Sensitive Enzymes. *Bacteriological Reviews* 1974; Vol. 38; №3: 291-335.
6. Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей / Под ред. Страчунского Л.С., Козлова С.Н. М.: Боргес, 2002, 432 с.
7. 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.
8. Walter E. Wright, Judith A. Frogge. Hydrolysis of 3-Acetoxyethyl Cephalosporins by Lysed WholeBlood. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 1980; Vol. 17; № 1: 99-100.
9. Menashi, A.C. A colometric procedure for measuring β -lactamase activity. *Analytical Biochemistry* 1988; V168: 252-258.
10. Веремей И.С., Жильцов И.В., Семенов В.М. и др. О возможности использования некоторых β -лактазных антибиотиков в качестве тест-объектов для определения β -лактамазной реактивности макроорганизма. Материалы Евро-Азиатского Конгресса по инфекционным болезням. Витебск, 2008; Том 1: 179-180.