

УДК 579:577.18:616-071

Предварительный анализ природы факторов сыворотки человеческой крови, обладающих бета-лактамазной активностью

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

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

Interim Analysis of Nature of Human Blood Serum Factors Possessing Beta-Lactamase Activity

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

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Антибиотикоустойчивость болезнетворных бактерий считается одной из наиболее актуальных проблем современной инфектологии; тем не менее, до настоящего времени данное явление рассматривалось лишь как свойство микроорганизмов.

В процессе изучения каталитических антител (абзимов), обладающих бета-лактамазной активностью, мы случайно обнаружили необычно высокий уровень пенициллиназной активности плазмы человеческой крови, значительно превышающий таковой у ранее описанных нами абзимов (И.В. Жильцов, 2001). Настоящее исследование было предпринято с целью установить истинную природу факторов, опосредующих высокую бета-лактамазную активность человеческой крови. Мы разделили белки крови на фракции с различным молекулярным весом путем осаждения сульфатом аммония в концентрациях 33%, 40% и 50%; производился анализ как осадка, так и надосадка. Кроме того, в исследование были включены пробы нативной сыворотки крови. Все пробы диализовались трехкратно против 0,85% раствора NaCl. Бета-лактамазная активность проб определялась при помощи модифицированного неокупроинового метода (А. Менаша, 1988), концентрация белка в пробе - по методу Лоури (О.Н. Лоури, 1951). Диализ производился с использованием диализных мешков Sigma D6191-25EA с порами, пропускающими белки с молекулярной массой менее 12 кДа. Оказалось, что в сыворотке человеческой крови содержатся минимум две фракции, обладающие пенициллиназной активностью: «легкая», опосредующая около 90% всей бета-лактамазной активности крови, с молекулярной массой частиц менее 12 кДа, и «тяжелая», обуславливающая около 10% всей бета-лактамазной активности крови. Данная фракция, вероятно, почти исключительно представлена гамма-глобулинами.

Summary

Bacterial antibiotic resistance is known as one of the most challenging problems of up-to-date infectology, but this phenomenon is still analyzed from the side of bacteria only.

Examining human blood serum for presence of catalytic antibodies (abzymes) we accidentally found high level of penicillinase-like activity, significantly higher than those expressed by polyclonal IgG studied before (I. Zhylytsou, 2001). Our present study was undertaken in order to find out the true nature of factors determining high beta-lactamase activity of human blood. We divided blood proteins in fractions with sedimentation by ammonium sulfate in concentrations of 33%, 40% and 50%; both sediment and supernatant samples were examined. Besides, intact blood serum samples were included in investigation. All samples were dialyzed three-fold against 0,85% solution of NaCl. Beta-lactamase activity of samples was determined via modified neocuproine technique (A. Menashi, 1988), protein concentration was measured using Lowry technique (O.H. Lowry, 1951). Dialysis was performed with the application of Sigma dialysis sacks D6191-25EA with pores what let through the proteins with molecular weight below 12 kDa. It turned out that human blood serum contains at least 2 fractions possessing beta-lactamase activity: "light" one, determining about 90% of total beta-lactamase activity of blood, with molecular weight below 12 kDa, and "heavy" one what explains about 10% of total beta-lactamase activity of blood. Perhaps, the last fraction is predominantly composed by gamma-globulins.

The data revealed give us valuable key to understanding of mechanism of beta-lactamase activity of human blood, as well as enable us to plan further experiments on exact identification of factors possessing this activity.

Полученные нами сведения дают ценный ключ к пониманию механизма бета-лактамазной активности крови, а также позволяют планировать дальнейший ход исследований по идентификации факторов, опосредующих эту активность.

Ключевые слова

Бета-лактамазная активность плазмы крови, неокупроиновый метод, «легкая» и «тяжелая» белковые фракции.

Инфекционный процесс, клинически проявляющийся явлениями того или иного инфекционного заболевания, является процессом сложного многоуровневого взаимодействия микро- и макроорганизма. Результат этого взаимодействия может быть различен и зависит от уникального для каждого случая сочетания экзогенных и эндогенных факторов - состояния специфической и неспецифической иммунной реактивности у восприимчивого индивидуума, патогенности и вирулентности конкретного штамма микроорганизма, воздействия проводимой в данный момент или ранее медикаментозной и немедикаментозной терапии, а также благоприятных или неблагоприятных микро- и макроклиматических условий, социального положения индивидуума и даже его эмоционально-психологического фона: так, давно замечено, что в условиях стресса уровень иммунной реактивности снижается, иногда до критически низких величин [1]. В результате инфекционный процесс может завершиться развитием острой циклической формы инфекционного заболевания с последующим полным выздоровлением, хронической формы заболевания с различной активностью процесса, латентной или субклинической формы без болезненных проявлений, «здорового» носительства возбудителя, которое многие исследователи приравнивают к хроническому заболеванию с минимальной активностью, а также «транзиторного» носительства с быстрой и полной элиминацией возбудителя из организма без развития клинической картины заболевания; во всех этих случаях в организме-хозяине разворачивается специфический иммунный ответ.

Сложность, многогранность и непредсказуемость исходов данного процесса давно уже не вызывают удивления исследователей и клиницистов. Тем не менее, один из аспектов инфек-

Key words

Beta-lactamase activity of human blood serum, neo cuproine technique, "light" and "heavy" protein fractions.

ционного процесса традиционно рассматривается только «со стороны» микроорганизма, и аспект этот - *антибиотикоустойчивость*.

Когда заходит речь об устойчивости к бета-лактамам антибиотикам, практически всегда имеют в виду антибиотикорезистентность бактерий, опосредованную синтезом разнообразных бета-лактамаз. При этом забывают, что макроорганизм также небезразличен к введению антибиотиков. Антибиотики являются для организма чужеродными веществами, от которых он стремится освободиться любой ценой, используя для этого разнообразные механизмы. 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) [2, 3]. Формирование в организме таких антител, обладающих каталитической активностью («абзимов») объясняется исходя из теории иммунологических сетей Эрне [4].

Кроме того, в процессе изучения каталитических антител, обладающих бета-лактамазной активностью, нами был случайно обнаружен феномен необычно высокой пенициллиназной активности сыворотки крови. Выяснилось, что данное свойство крови характерно для большинства (85-92%) больных и здоровых лиц (были изучены здоровые военнослужащие, а также больные рожей и пневмонией), уровень активности достаточно высок (за 20 минут инкубации при 37°C распалось в среднем 52% от внесенного в пробу сыворотки крови ампициллина и 78% от внесенного в пробу бензилпенициллина (концентрация обоих антибиотиков в опыте составляла 0,18 мг/мл) [5]. Рационально объяснить наблюдаемый феномен в настоящее вре-

мя затруднительно. Так, 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 обладали. Следует отметить, что в данном случае бета-лактаманная связь не разрушалась, из-за чего цефалоспорины, не содержащие 3-ацетоксиметильной группы (цефалоридин, цефалексин, цефамандол, цефазолин), не утрачивали активности в присутствии гемолизированной крови [6]. В нашем же случае а) анализируемые пробы сыворотки крови не имели признаков гемолиза, и б) происходил распад антибиотиков пенициллинового ряда по бета-лактаманной связи, что и фиксировалось неокупроиновым реактивом, который образует окрашенные комплексы только в присутствии гидролизованной бета-лактаманной связи различных производных 6-аминопенициллановой кислоты [7]. При этом считается, что ферменты с бета-лактаманной активностью в человеческом организме отсутствуют, а антибиотики соответствующей группы выводятся из организма в неизменном виде с мочой и в меньшей степени - с желчью [8]. Таким образом, природа обнаруженного нами явления остается загадочной.

Соответственно, целью настоящего исследования было установление истинной природы факторов, обуславливающих значительную бета-лактаманную активность крови.

Материалы и методы

1. Получение сыворотки крови

Сыворотка крови больных была получена центрифугированием крови, выдержанной в холодильной камере при 4°C в течение 4-6 часов для образования фибринного сгустка; производилось центрифугирование в угловой центрифуге при 3000 об/мин в течение 15 минут. Пробы с визуальными признаками гемолиза исключались из эксперимента.

2. Получение фракций сыворотки крови

Разделение сыворотки крови на фракции было осуществлено следующим образом: пулированная сыворотка крови, полученная от 4 больных (ОРИ, пневмония, обострение хронического бронхита, рожа) общим объемом

10 мл была разделена на 5 проб по 2 мл. В трех пробах произведено осаждение белков добавлением насыщенного раствора сульфата аммония (квалификации ч.д.а.) до суммарной концентрации 33, 40 и 50% насыщения. Осаждение белков происходило в течение 30 минут при +4°C. Выпавший осадок отделялся центрифугированием в угловой центрифуге при 6.000 об/мин в течение 15 мин; надосадок отделялся, после чего осадок в каждой пробе растворяли в 2 мл 0,85% раствора натрия хлорида и повторно осаждали добавлением насыщенного раствора сульфата аммония до исходной концентрации (33, 40 и 50%, соответственно); при этом осаждение белков проходило в условиях, идентичных описанным выше. Выпавший осадок вновь отделялся центрифугированием при 6.000 об/мин в течение 15 мин, надосадок выливали, а осадок ресуспендировали в 2 мл 0,85% раствора натрия хлорида.

Далее производился трехкратный диализ полученных проб (осадка, растворенного в физиологическом растворе хлорида натрия, и надосадка, собранного после первого центрифугирования, отдельно для каждой концентрации сульфата аммония) против 0,85% раствора натрия хлорида в объеме 2 л, каждый раз в течение 24 ч, при комнатной температуре. Параллельно в тех же условиях производился диализ одной из проб сыворотки крови (2 мл), где осаждение сульфатом аммония не производилось. Диализ второй пробы сыворотки крови (также 2 мл), не подвергавшейся осаждению сульфатом аммония, производился однократно против 5 мл 0,85% раствора натрия хлорида в течение 48 часов в герметично укупоренной емкости, диализат был в дальнейшем собран и использован для исследования.

В диализный раствор №1 во всех случаях, включая диализ против 5 мл 0,85% раствора натрия хлорида, добавлялся порошок азиды натрия (ч.д.а.) до конечной концентрации 0,1% с целью профилактики роста бактерий в пробах.

Для диализа были использованы диализные пакеты Sigma D6191-25EA с порами, задерживающими все белки с молекулярным весом вплоть до 12 кДа. Полученные таким образом пробы сохранялись в морозильной камере при -20°C. Допускалось только однократное размораживание проб непосредственно перед экспериментом. Предварительно был произведен посев образцов материала

из каждой пробы на мясо-пептонный агар (инкубация в течение 24 часов при 37°C). Кроме того, в каждой пробе был произведен замер концентрации белка по стандартной методике Лоури [9].

В дальнейшем была определена бета-лактамазная активность всех проб модифицированным неокупроиновым методом [5, 7].

3. Определение бета-лактамазной активности проб сыворотки крови модифицированным неокупроиновым методом

В качестве субстратов для определения каталитической активности сыворотки крови мы использовали химически чистые субстанции бензилпенициллина натриевой соли и ампициллина тригидрата.

0,15 мл раствора каждого из антибиотиков в концентрации 0,18 мг/мл смешивали с исследуемой пробой в соотношении 1:1 и помещали в термостат ($t=37^{\circ}\text{C}$) на 20 минут. Спустя указанное время к тест-объектам прибавляли 30 мкл 57% водного раствора хлорной кислоты для осаждения белковой матрицы.

В качестве контроля использовали модельные растворы бензилпенициллина и ампициллина, разведенные дистиллированной водой в соотношении 1:1 с последующим добавлением 30 мкл 57% водного раствора хлорной кислоты.

Все тест-объекты после добавления хлорной кислоты встряхивали на вортексе в течение 2 минут и центрифугировали при 3000 об/мин в продолжение 10 минут, после чего отбирали для анализа надосадочную жидкость. Учитывая вероятность потерь антибиотика с белковым осадком, был введен дополнительный контроль. Для этого растворы антибиотиков, предварительно полностью гидролизованых кипячением с 0,2 М гидроокисью натрия, вносили в испытуемые сыворотки в количестве, аналогичном опытным пробам, и далее проводили депротеинизацию, как указано выше.

В дальнейшем к исследуемым растворам прибавляли ацетатный буфер ($\text{pH}=4,75$), неокупроиновый реагент и выдерживали пробы при комнатной температуре в течение 30 минут до развития стабильной желтой окраски. Спустя указанное время измеряли оптическую плотность образовавшихся комплексов при 454,5 нм. Измерение оптических плотностей проводили на спектрофлуориметре SOLAR-SM2203, (гос. рег. № РБ 03 11 2864 06) в режиме спектрофотометрии.

В дальнейшем определялась доля антибиотика, распавшегося в пробе за время инкубации, как отношение ОП в опытной пробе к ОП соответствующей контрольной пробы. Вычисленное значение выражалось в процентах.

Результаты и обсуждение

Ни в одной из чашек Петри с мясо-пептонным агаром не было отмечено роста бактерий.

Полученные в эксперименте уровни распада ампициллина и бензилпенициллина, внесенных в исследуемые пробы, а также измеренная по Лоури концентрация общего белка в пробах приведены в таблице 1.

Графическое отображение указанных числовых значений приведено на рисунках 1 и 2.

Видно, что бета-лактамазная активность белкового осадка относительно невысока и составляет от 6,7% до 12% для ампициллина и от 6,4% до 19,2% для бензилпенициллина; при этом уровень распада ампициллина практически не зависел от концентрации сульфата аммония, в то время как уровень распада бензилпенициллина нарастал по мере снижения концентрации сульфата аммония (от 50% к 33%). Следует принять во внимание, что 33% сульфат аммония осаждает практически исключительно гамма-глобулины.

В пробах надосадочной жидкости бета-лактамазная активность оказалась минимальной - от 0 до 7,7% для ампициллина и от 1,8% до 3,2% для бензилпенициллина; данная активность явно не зависела от концентрации сульфата аммония в растворе.

В пробе сыворотки крови №1, диализовавшейся однократно против 5 мл 0,85% раствора хлорида натрия, уровень распада ампициллина составил 58,5%, а бензилпенициллина - 75,8%. В диализном же растворе данные уровни оказались равны 58,7% и 63,0%, соответственно. Следовательно, с учетом погрешности методики определения можно считать, что бета-лактамазная активность практически поровну распределилась между данной пробой сыворотки и диализным раствором. При этом обращает на себя внимание существенная разница в концентрациях общего белка в сыворотке крови (22 г/л) и диализном растворе (3,7 г/л).

В пробе сыворотки крови №2, диализовавшейся трехкратно против несопоставимо большего объема 0,85% раствора хлорида натрия, уровень распада ампициллина составил лишь 7,8%, а бензилпенициллина - 10,5%.

Таблица 1

Уровни распада бензилпенициллина и ампициллина (в % от исходного количества в пробе) и концентрация общего белка в исследуемых пробах по Лоури

Название образца	% распавшегося в пробе ампициллина (от внесенного)	% распавшегося в пробе бензилпенициллина (от внесенного)	Концентрация белка в пробе по Лоури (г/л)
Проба сыворотки крови №1, диализованная против 5 мл 0,85% раствора натрия хлорида	58,45	75,80	22,0
Диализный раствор 0,85% раствора натрия хлорида (от пробы сыворотки крови №1)	58,71	63,01	3,65
Проба сыворотки крови №2, трехкратно диализованная против 2 л 0,85% раствора натрия хлорида	7,77	10,50	24,45
Осадок после осаждения 33% сульфатом аммония	10,19	19,18	9,89
Осадок после осаждения 40% сульфатом аммония	6,70	10,50	10,12
Осадок после осаждения 50% сульфатом аммония	12,87	6,39	12,0
Надосадок после осаждения 33% сульфатом аммония	7,77	1,83	18,02
Надосадок после осаждения 40% сульфатом аммония	0	1,83	18,17
Надосадок после осаждения 50% сульфатом аммония	0	3,20	8,14

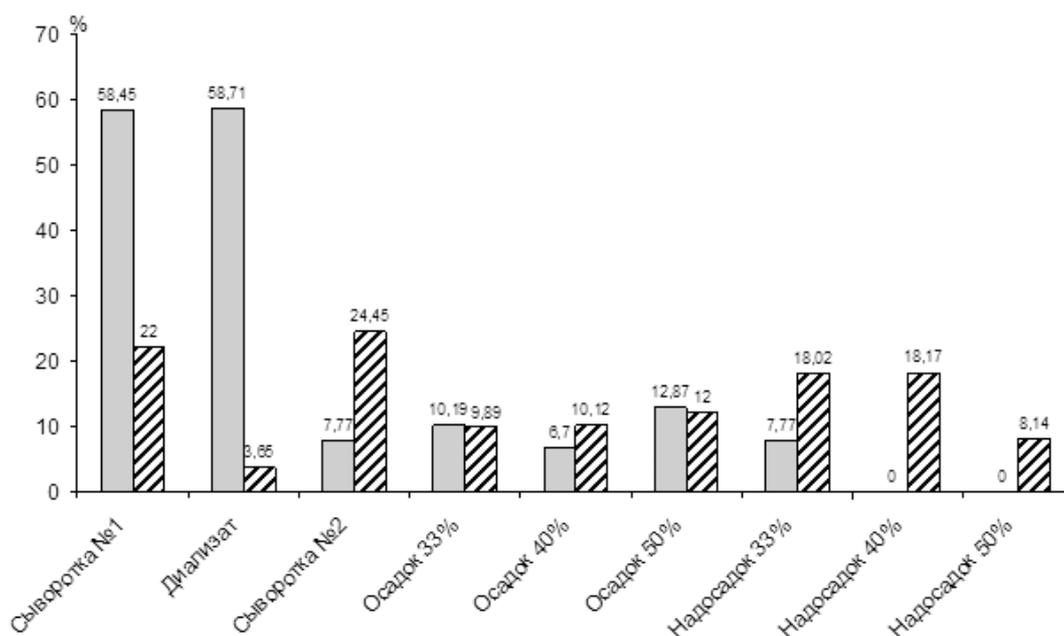


Рис. 1. Уровень распада ампициллина в пробах (в % от внесенного), наложенный на концентрацию общего белка в этих же пробах (г/л)

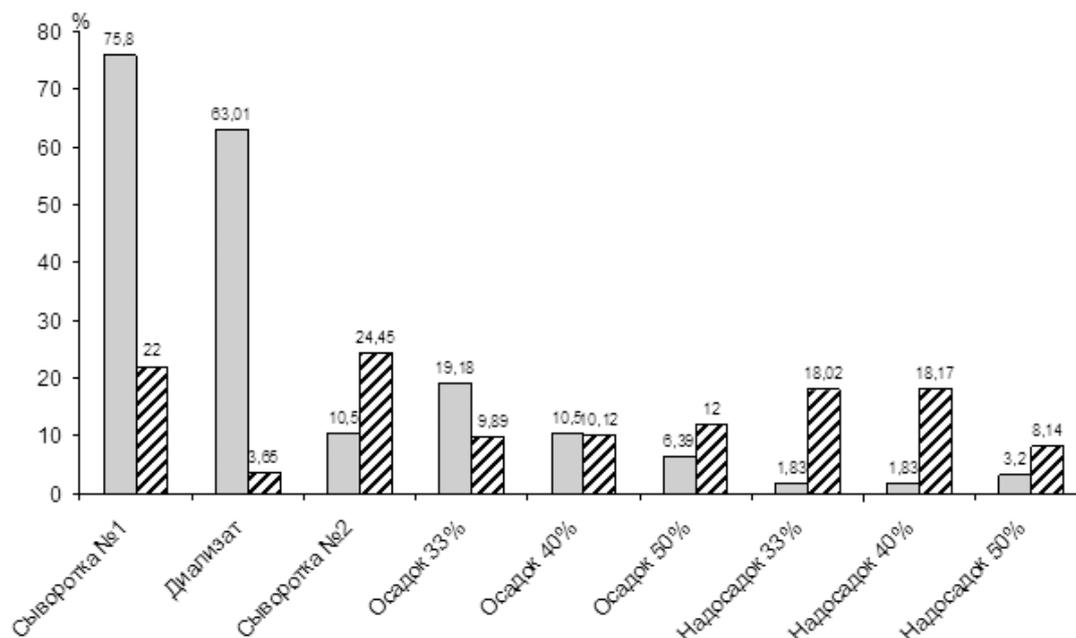


Рис. 2. Уровень распада бензилпенициллина в пробах (в % от внесенного), наложенный на концентрацию общего белка в этих же пробах (г/л)

Уровень распада ампициллина достоверно коррелировал с уровнем распада бензилпенициллина (метод ранговых корреляций Спирмена, $r = +0,73$, $p < 0,05$). Достоверных корреляционных зависимостей между уровнем бета-лактамазной активности и концентрацией общего белка в пробах выявлено не было. При анализе графиков видно, например, что уровни белка в пробах сыворотки №1 и №2 практически одинаковы (22 и 24,5 г/л, соответственно), при этом их бета-лактамазная активность различается в 7,5 раз по уровню распада ампициллина и в 7,2 раза по уровню распада бензилпенициллина. В то же время в пробах белкового осадка, полученных при осаждении 50%, 40% и 33% сульфатом аммония, концентрации собственно белка варьируют незначительно (от 9,9 до 12 г/л), равно как и уровень распада ампициллина (разница не более 20%).

Таким образом, из результатов эксперимента следует, что в человеческой крови существует некая фракция с молекулярным весом менее 12 кДа, обладающая пенициллиназной активностью. Возможно, данная фракция представляет собой комплекс из низкомолекулярных пептидов и продуктов распада гема. Так, в предыдущих наших исследованиях (еще неопубли-

кованных) было показано, что концентрация общего и прямого билирубина в крови больных рожей и пневмонией прямо коррелирует с уровнем распада бензилпенициллина, коэффициент корреляции составил 0,9-1. Эта фракция полностью отделяется от сыворотки крови при многократном диализе против значительного объема физиологического раствора и определяет 81-92% от общей бета-лактамазной активности крови. В частности, эта фракция целиком удаляется из надосадочной жидкости при диализе, вследствие чего указанная жидкость практически не проявляет пенициллиназную активность, независимо от концентрации сульфата аммония в пробах. Концентрация данной «легкой» фракции не превышает 3,5 г/л; не исключено, что эта фракция имеет биоорганическую, но небелковую природу.

Одновременно в крови присутствует фракция высокомолекулярных белков (преимущественно - гамма-глобулинов), обуславливающих оставшиеся 8-19% бета-лактамазной активности крови. Эти белки преимущественно содержатся в белковом осадке, причем их общее количество во всех пробах примерно одинаково (около 10 г/л); вероятно, именно поэтому каталитическая активность проб белкового

осадка практически не меняется при изменении концентрации общего белка в соответствующих пробах (и не зависит от концентрации сульфата аммония). Интересно, что в пробе белкового осадка, полученного осаждением 33% сульфатом аммония, уровень распада бензилпенициллина оказался наивысшим по сравнению с другими пробами белкового осадка (19,2%); как уже упоминалось выше, эта проба должна содержать практически исключительно белки гамма-глобулиновой фракции. Возможно, данный феномен объясняется устранением стерических (пространственных) препятствий к взаимодействию между молекулами бета-лактамовых антибиотиков и активными центрами молекул иммуноглобулинов при снижении концентрации прочих белков в пробе.

Данные выводы, полученные на основании косвенных экспериментальных данных, хорошо согласуются с ранее полученными нами сведениями, согласно которым, в крови больных и здоровых лиц имеются поликлональные иммуноглобулины (IgG 1, 2 и 4 субклассов), обладающие относительно невысокой, но достоверной бета-лактамазной активностью [2, 3]. Тем не менее, выявленные на основании косвенных данных закономерности требуют дальнейшего всестороннего экспериментального подтверждения.

Заключение

В плазме крови человека содержатся минимум две фракции, обладающие пенициллиназной активностью:

1. «Легкая», опосредующая около 90% всей бета-лактамазной активности крови, с молекулярной массой частиц менее 12 кДа, возможно, небелковой природы (если указанная фракция - белковой природы, то концентрация этих белков, с учетом разведения при обработке проб, не превышает 9 г/л). Данная фракция полностью отделяется от сыворотки крови при диализе;

2. «Тяжелая», обуславливающая около 10% всей бета-лактамазной активности крови. Данная фракция, вероятно, почти исключительно представлена гамма-глобулинами (средняя концентрация около 10 г/л); эти белки полностью или почти полностью осаждаются из плазмы крови любой концентрацией сульфата аммония из использованных в данном эксперименте (от 33% до 50%).

Полученные нами сведения дают ценный ключ к пониманию механизма бета-лактамазной активности крови, а также позволяют планировать дальнейший ход исследований по идентификации факторов, опосредующих эту активность.

Литература

1. Суздальницкий Р.С., Левандо В.А. Иммунологические аспекты спортивной деятельности человека. Теория и практика физической культуры: научно-теоретический журнал; 1998; №10: 43-46.
2. Жильцов И.В., Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Генералов И.И. Особенности «биологической» антибиотикоустойчивости при шигеллезах: выявление *in vivo* поликлональных IgG, обладающих пенициллиназной активностью. Медицинская панорама; 2006; №5 (62): 46-48.
3. Жильцов И.В., Генералов И.И., Семенов В.М. Выявление абзимов с пенициллиназной активностью в сыворотке крови больных шигеллезами. Иммунопатология, аллергология, инфектология; 2004; №3: 90-93.
4. Jerne N.K. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol. (Inst.Pasteur)*; 1974; Vol.125, №1-2: 373-389.
5. Жильцов И.В., Веремей И.С., Семенов В.М. и др. Бета-лактамазная активность белков человеческой крови: новый взгляд на патогенез антибиотикоустойчивости. Иммунопатол., аллергол., инфектол.; 2008; №2: 77-83.
6. E. Walter Wright, A. Judith Frogge Hydrolysis of 3-Acetoxyethyl Cephalosporins by Lysed WholeBlood. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*; 1980; Vol. 17, № 1: 99-100.
7. Menashi A.C., Abraham J., Antone Menashi A.M. A colorimetric procedure for measuring b-lactamase activity. *Analytical Biochemistry*; 1988; 168: 252-258.
8. Страчунский Л.С. Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей. Под ред. Страчунского Л.С., Козлова С.Н. М.: Боргес, 2002; 432 с.
9. Lowry O.H., Rosbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Quantitation of Protein. *J. Biol. Chem.*; 1951; 193: 265.

Статья поступила 23.12.2008 г.