

Мікоплазменна пневмонія: сучасні підходи до діагностики та лікування

О.К. ДУДА, В.І. ТРИХЛІБ

В статті розглянуто сучасні підходи до діагностики та лікування мікоплазменних уражень легень. Висвітлено досвід застосування ПЛР діагностики та лікування даної категорії хворих.

Ключові слова: мікоплазменна пневмонія, лікування, полімеразна ланцюгова реакція

Mycoplasmal pneumonia: modern approaches to diagnostic and therapy

A. DUDA, V. TRYKHLIB

In the article modern approaches to diagnostic and therapy of mycoplasmal pneumonia are considered. The experience of using PCR for diagnostic and treatment of such patient category is shown.

Key words: mycoplasmal pneumonia, treatment, polymerase chain reaction

УДК 616.9

Особенности взаимодействия антибиотиков бета-лактаминового ряда с человеческим сывороточным альбумином

**И.В. ЖИЛЬЦОВ, И.С. ВЕРЕМЕЙ, В.М. СЕМЕНОВ,
И.И. ГЕНЕРАЛОВ, С.К. ЕГОРОВ, Е.Н. ПОЛЕШУК,
М.А. ВАСИЛЬЕВА, С.В. СЕМЕНОВ**

г. Витебск, Республика Беларусь

Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) способен эффективно разрушать бета-лактаминаую связь хромогенного цефалоспоринового нитроцефина. Для регистрации распада вышеперечисленных антибиотиков использовали ВЭЖХ-анализ с применением аппаратно-программного комплекса HPLC System Agilent 1100 Series (колонка Zorbax Eclipse XDB-C18 150×4,6 мм). Установлено, каталитическая активность ЧСА может вносить свой вклад в постепенную убыль концентрации указанных антибиотиков в крови, тем самым снижая их клиническую эффективность.

Ключевые слова: человеческий сывороточный альбумин, бета-лактаминавая активность, антибиотики бета-лактаминового ряда

Феномен собственной бета-лактаминавой активности человеческой крови известен достаточно давно. Так, в 1972 г. группа исследователей компании Glaxo Research Ltd, исследуя свойства недавно синтезированного ими хромогенного цефалоспоринового нитроцефина, описала значимый распад бета-лактаминавой связи указанного антибиотика

под воздействием, в числе прочего, сыворотки человеческой крови, причем было показано, что данное ее свойство опосредуется в первую очередь альбуминовой фракцией [1]. Тем не менее, углубленное исследование данного феномена на тот момент не производилось, реакция была сочтена неспецифической, и обнаруженное явление было забыто на много лет. В 1994 г. научный коллектив во главе с В. Nerli повторно описал феномен интенсивного распада нитроцефина под воздействием человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) [2, 3]. Попытка продемонстрировать распад некоторых других антибиотиков цефалоспоринового ряда (в частности, цефтриаксона, цефоперазона и цефсулодина) под воздействием ЧСА не увенчалась успехом, клиническое значение феномена не исследовалось, и в результате явление необычно высокой собственной бета-лактамазной активности человеческой крови осталось незамеченным научным сообществом. При этом еще в 1981 г. Н. Bruderlein установил, что аналоги карбапенемов (в частности, 2-метилпенем-3-карбоксиловая кислота) разрушаются альбуминами человеческой крови, причем данную активность опосредуют участки альбуминов, содержащие аминокислоты лизин и L-триптофан [4].

В 2007 г. явление необычно интенсивного распада нитроцефина под воздействием сыворотки человеческой крови было независимо обнаружено научной группой под руководством В.М. Семенова [5]. В 2009 г. указанный коллектив установил, что бета-лактамазная активность крови практически полностью опосредуется ЧСА, и в значительно меньшей степени – антиидиотипическими IgG.

Несмотря на довольно обширный список ранее проведенных исследований феномена, неясно, какие еще антибактериальные препараты, кроме нитроцефина и экспериментальных карбапенемов, способны распадаться под воздействием ЧСА, и, в целом, имеет ли бета-лактамазная активность альбумина какое-либо клиническое значение. В этой связи нами был предпринят ряд экспериментов, основной **целью** которых было установить, какие антибиотики бета-лактамного ряда из числа широко используемых в клинической практике способны взаимодействовать с ЧСА с последующим распадом их бета-лактамной связи. Изучался распад следующих антибиотиков: азтреонама, ампициллина, амоксициллина бензилпенициллина, имипенема, пиперациллина, цефалексина, цефокситина, цефоперазона, цефотаксима, цефтазидима, цефтриаксона и цефепима.

Материалы и методы

Для исследования особенностей взаимодействия антибиотиков из группы бета-лактамов с человеческим сывороточным альбумином мы использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (далее – ВЭЖХ). Данная методика не лишена недостатков – она не позволяет

непосредственно регистрировать факт распада собственно бета-лактамной связи антибиотика, фиксируя лишь убыль количества анализируемого вещества (что может быть связано с образованием метаболитов препарата, имеющих сохранную бета-лактамную связь и обладающих антимикробной активностью).

Для выполнения ВЭЖХ-анализа использовался аппаратно-программный комплекс HPLC System Agilent 1100 Series с установленной хроматографической колонкой Zorbax Eclipse XDB-C18 150×4,6 мм, размер частиц сорбента – 5 μm.

В качестве подвижной фазы (элюента) применялась смесь ацетонитрила (пр-во Sigma, HPLC gradient grade) и 0,01 М КН₂РO₄ (рН 3,0, доводится до нужной величины 85% фосфорной кислотой), подаваемая на вход колонки под давлением 150-170 бар (в одном из вариантов вместо 0,01 М раствора однозамещенного фосфата калия с рН 3,0 использовался 0,01 М ФБР с рН 7,4). Состав подвижной фазы был подобран таким образом, чтобы интересующий исследователей антибиотик регистрировался на выходе колонки на 6-9 минуте анализа (соотношения объемных долей ацетонитрила и фосфатного буфера, использованные нами для ВЭЖХ-определения различных антибактериальных препаратов, приведены в таблице). Регистрация проводилась путем динамического (5 раз в секунду) замера уровня поглощения выходящего из колонки элюата в ультрафиолетовом диапазоне при λ=210, 225, 230, 235, 260, 266 либо 300 нм, в зависимости от определяемого препарата (режимы определения см. в таблице 1). Информация о спектре поглощения ультрафиолетового излучения растворами соответствующих антибиотиков была найдена в энциклопедии Кларка по химическому анализу лекарственных веществ и ядов [6]. Наличие в пробе изучаемого антибиотика определялось по наличию пика поглощения на соответствующей (заранее установленной) минуте анализа, а изменение концентрации данного антибиотика в динамике устанавливалось по уменьшению площади под кривой (ППК) данного пика при последующих замерах.

Перечень антибактериальных препаратов, включенных в эксперимент, также приведен в таблице 1 (все – химически чистые субстанции пр-ва Sigma). Концентрация антибиотиков в растворе подбиралась таким образом, чтобы 1 молю препарата соответствовал 1 моль человеческого сывороточного альбумина (т.е. указанные концентрации были эквивалентными). Был использован раствор человеческого сывороточного альбумина, полученного на Витебской областной станции переливания крови спиртовой седиментацией по Кону (Cohn), с рабочей концентрацией 100 мг/мл. Данный раствор смешивался с рабочим (2×) раствором соответствующего антибиотика в соотношении 1:1, после чего концентрация альбумина в пробе составляла 50 мг/мл (что

примерно соответствует его сывороточной концентрации), а антибиотика – как указано в таблице 1.

Таблица

Режимы ВЭЖХ-определения количества изучаемых антибиотиков бета-лактамного ряда в аналитической смеси

Препарат (концентрация)	% ацето- нитрила	% фосфатного буфера	вид использованного буфера	λ , нм	время удерживания, мин
азтреонам 0,314 мг/мл	10	90	0,01 М КН ₂ РО ₄ (рН 3,0)	260	6,2
амоксциллин 0,263 мг/мл	1	99	0,01 М КН ₂ РО ₄ (рН 3,0)	230	6,9
ампициллин 0,252 мг/мл	10	90	0,01 М КН ₂ РО ₄ (рН 3,0)	225	5,2
бензилпенициллин 0,241 мг/мл	25	75	0,01 М КН ₂ РО ₄ (рН 3,0)	210	9,8
имипенем 0,216 мг/мл	1	99	0,01 М ФБР (рН 7,4)	300	3,1
пиперациллин 0,373 мг/мл	25	75	0,01 М КН ₂ РО ₄ (рН 3,0)	260	13,3
цефалексин 0,250 мг/мл	10	90	0,01 М КН ₂ РО ₄ (рН 3,0)	260	6,7
цефокситин 0,308 мг/мл	18	82	0,01 М КН ₂ РО ₄ (рН 3,0)	235	6,4
цефоперазон 0,465 мг/мл	25	75	0,01 М КН ₂ РО ₄ (рН 3,0)	230	6,2
цефотаксим 0,328 мг/мл	10	90	0,01 М КН ₂ РО ₄ (рН 3,0)	260	11,0
цефтазидим 0,394 мг/мл	10	90	0,01 М КН ₂ РО ₄ (рН 3,0)	260	3,7
цефтриаксон 0,400 мг/мл	10	90	0,01 М КН ₂ РО ₄ (рН 3,0)	260	7,9
цефепим 0,346 мг/мл	2	98	0,01 М КН ₂ РО ₄ (рН 3,0)	260	7,4

В качестве контрольных проб использовались рабочие растворы исследуемых антибиотиков, разведенные в 2 раза добавлением равного объема 0,1 М ФБР, рН 7,4. Контрольные и опытные пробы инкубировались при 37°C в течение 3240 минут (54 часов), причем содержание исследуемых антибиотиков в них замерялось перед началом инкубации (замер 0), затем – каждые 15 минут до истечения первого часа инкубации, затем – каждые 30 минут до истечения 2 часа инкубации, затем – каждый час до истечения 6 часов инкубации, затем – на 1440, 1800, 2940 и 3240 минутах инкубации. По результатам замеров вычислялась доля

антибиотика (в% от исходно внесенного в пробу его количества), содержащаяся в каждой паре проб на момент регистрации хроматограммы, и на основании полученных данных строились кривые убыли антибиотиков в пробах, после чего при помощи программы MS Excel 2007 подбирались модели (линейные и экспоненциальные), наиболее точно описывающие построенные кривые. Достоверность различий математических моделей убыли изучаемых антибиотиков в соответствующих парах опытных и контрольных проб определялась при помощи F-теста (extra sum-of-squares F test) с использованием специализированной программы для графической обработки химико-аналитических данных GraphPad Prism 5.00.

Перед загрузкой смеси ЧСА с антибиотиком-субстратом на ВЭЖХ-колонку производилась депротеинизация: к 1 объему пробы добавлялось 2 объема х.ч. 99% метанола, проба энергично встряхивалась на шейкере, после чего образовавшийся осадок отделялся центрифугированием при 14.000 об/мин в течение 5 минут, а надосадок использовался для проведения ВЭЖХ-анализа [7].

Для доказательства факта распада именно бета-лактамной связи в процессе взаимодействия ЧСА и некоторых антибактериальных препаратов (бензилпенициллина, пиперациллина) к 0,4 мл рабочего раствора соответствующего антибиотика добавлялось 10 мкл концентрированного раствора бактериальной пенициллиназы (что соответствует 100 ЕД данного препарата), после чего производилось ВЭЖХ-определение концентрации антибиотиков непосредственно после внесения пенициллиназы и через 30 минут инкубации при комнатной температуре (приблизительно 22°C). На хроматограмме фиксировалась убыль искомого антибиотика и рост концентрации продуктов распада, определяемые по изменению площади под соответствующими пиками; время удержания продуктов распада известного происхождения (т.е. образовавшихся вследствие воздействия бактериальной пенициллиназы) в дальнейшем сравнивалось со временем удержания продуктов распада, образовавшихся в процессе взаимодействия исследуемых антибиотиков и ЧСА.

Результаты

Проведенные нами многочисленные эксперименты (было зарегистрировано более 300 хроматограмм) показали, что большая часть изученных антибиотиков (9 – ампициллин, амоксициллин, цефоперазон, пиперациллин, цефтазидим, цефтриаксон, цефотаксим, цефокситин и цефепим) не взаимодействует с альбумином – кривые распада соответствующих антибактериальных препаратов с течением времени в опытных (с альбумином) и контрольных (самораспад) пробах оказались практически идентичными, а разница между ними – недостоверной ($p > 0,05$).

В то же время, распад 4 антибиотиков (бензилпенициллина, цефалексина, азтреонама и имипенема) под воздействием ЧСА статистически значительно ускорялся по сравнению со спонтанным распадом в контрольных пробах, причем разница между уровнями распада в опытных и контрольных пробах оказалась высокодостоверна (во всех случаях $p < 0,0001$). Интересно, что при взаимодействии с цефоперазоном и пиперациллином альбумин проявлял протективное воздействие на данные антибиотики – через 54 часа их содержание в опытных пробах было соответственно на 21,4% и 7,8% выше, чем в контрольных (данные статистически значимы, для цефоперазона $p = 0,017$, для пиперациллина – 0,0001).

Коэффициенты корреляции математических моделей, описывающих убыль изучаемых антибактериальных препаратов в парах контрольных и опытных проб с течением времени, составили: для бензилпенициллина – 0,999 (обе модели), для цефалексина – 0,999 (обе модели), для азтреонама – 0,979 (самораспад данного препарата за время исследования практически отсутствовал), для имипенема – 0,998 (самораспад) и 0,999 (проба с альбумином). Таким образом, можно говорить об очень хорошем соответствии построенных нами моделей реально наблюдаемым результатам замеров.

Обращает на себя внимание экспоненциальный вид графиков убыли количества бензилпенициллина и цефалексина в опытных пробах (т.е. при взаимодействии с ЧСА). Данная форма кинетических кривых характерна для реакций 1-го порядка, типичных для «настоящих» ферментов. В случае же с азтреонамом и имипенемом имеет место каталитическая реакция нулевого порядка, не зависящая от концентрации субстрата, поскольку графики убыли соответствующих препаратов в опытных пробах имеют линейный вид.

Добавление 100 ЕД пенициллиназы к рабочему раствору бензилпенициллина с последующей регистрацией хроматограммы показало, что время удержания единственного образующегося при этом продукта распада (2,7 минуты) в точности соответствует времени удержания единственного продукта распада, образующегося при взаимодействии бензилпенициллина с ЧСА (также 2,7 минуты); пик хроматограммы, соответствующий данному продукту распада, становится заметен спустя 24 часа инкубации опытной пробы при 37°C, и в дальнейшем площадь под кривой данного пика неуклонно возрастает с течением времени. Таким образом, можно считать доказанным, что при взаимодействии ЧСА и бензилпенициллина происходит гидролиз последнего по бета-лактамной связи, как и при воздействии «настоящих» пенициллиназ.

Согласно полученным нами данным, к 6 часу с момента парэнтерального введения обсуждаемых антибактериальных препаратов

их взаимодействие с ЧСА обусловит гидролиз дополнительных (к уровню самораспада) 2,3% азтреонама, 7,5% бензилпенициллина, 10,8% цефалексина и 11,9% имипенема. Таким образом, каталитическая активность ЧСА может вносить свой вклад в постепенную убыль концентрации указанных антибиотиков в крови, тем самым снижая их клиническую эффективность.

Выводы

1. Бета-лактамазная активность ЧСА проявляется не только в отношении нитроцефина, но и по отношению к некоторым другим препаратам бета-лактаминового ряда, в частности, бензилпенициллину, цефалексину, азтреонаму и имипенему. Ускорение распада данных препаратов под воздействием альбумина статистически значимо. Таким образом, бета-лактамазная активность сыворотки крови не является частным феноменом, касающимся только нитроцефина, а имеет реальное клиническое значение.

2. Распад бензилпенициллина и цефалексина, катализируемый ЧСА – реакция первого порядка, в то время как аналогичный распад азтреонама и имипенема – реакция нулевого порядка.

3. Взаимодействие ЧСА с бензилпенициллином определенно приводит к распаду бета-лактамина связи последнего.

4. Взаимодействие ЧСА с пиперациллином и цефоперазоном препятствует спонтанному гидролизу данных антибиотиков.

Литература

1. O'Callaghan H.C. Novel method for detection of b-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate / H.C. Callaghan, A. Morris, S.M. Kirby, A.H. Shingler // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1972. – Vol. 1, № 4. – P. 283–288.

2. Nerli B. Evidence of human serum albumin beta-lactamase activity / B. Nerli, G. Picó // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1994. – Mar., Vol. 32 (4). – P. 789–795.

3. Nerli B. An unknown hydrolase activity of human serum albumin: beta-lactamase activity / B. Nerli, F.García, G. Picó // *Biochem Mol Biol Int.* – 1995. – Nov., 37 (5): P. 909–915.

4. Bruderlein H. An investigation of the destruction of the beta-lactam ring of penems by the albumin drug-binding site / H. Bruderlein, R. Daniel, D. Perras [et al.] // *Can J Biochem.* – 1981. – Vol.59 (10). – P. 857–866.

5. Жильцов И.В. Необычно высокий уровень распада антибиотиков бета-лактамина группы в человеческой плазме и сыворотке крови / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов // *Материалы Евро-Азиатского Конгресса по инфекционным болезням*. – Витебск, 2008. – Том 1. – С. 85–86.

6. Anthony C. Moffat, M. David Osselton, Brian Widdop / *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. – Pharmaceutical Press, 2005 – P. 564.

7. Luis Renato Pires de Abreu, Rodrigo Agustin Mas Ortiz / HPLC determination of amoxicillin comparative bioavailability in healthy volunteers after a single dose administration // *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* – 2003. – 6 (2): 223–230.

**Особенности взаимодействия антибиотиков бета-лактамногo ряда
з людським сироватковим альбуміном**

**І.В. МЕШКАНЦІВ, І.С. ВЕРЕМІЙ, В.М. СЕМЕНОВ, І.І. ГЕНЕРАЛОВ,
С.К. ЄГОРОВ, Е.Н. ПОЛЕШУК, М.А. ВАСИЛЬЄВА, С.В. СЕМЕНОВ**

Людський сироватковий альбумін (ЧСА) здатний ефективно руйнувати бета-лактамною зв'язок хромогенного цефалоспорина нитроцефінa. Для реєстрації розпаду вищеперелічених антибіотиків використовували ВЭЖХ-анализ із застосуванням апаратно-програмного комплексу HPLC System Agilent 1100 Series (колонка Zorbax Eclipse XDB-C18 150×4,6 мм). Встановлено, каталітична активність ЧСА може вносити свій вклад до поступового спаду концентрації вказаних антибіотиків в крові, тим самим знижуючи їх клінічну ефективність.

Ключові слова: людський сироватковий альбумін, бета-лактамазная активність, антибіотики бета-лактамногo ряду

Features of co-operation of antibiotics of β -lactam row with a human seralbumin

**I. ZHYLTSOV, I. VEREMEY, V. SEMENOV, I. GENERALOV,
S. EGOROV, E. POLESHUK, M. VASIL'eva, S. SEMENOV**

Human serum albumin (HSA) is capable of efficient destruction of beta-lactam bond of chromogenic cephalosporin antibiotic – nitrocefín. We used HPLC analysis for the detection of hydrolysis of the above mentioned antibacterials (namely, HPLC System Agilent 1100 Series equipped with the column Zorbax Eclipse XDB-C18 150×4,6 mm). Definitely, catalytic activity of HSA can do its part in gradual decrease of blood concentration of the above listed antibiotics thus reducing their clinical efficacy.

Key words: human serum albumin, beta-lactam antibiotics, beta-lactamase activity

УДК: 616.36-002-022:616.15(86)

**Эпидемиологические факторы риска у больных с острыми и
хроническими парентеральными вирусными гепатитами**

И.А. ЗАЙЦЕВ, В.А. МИРОШНИЧЕНКО, В.Т. КИРИЕНКО

г. Донецк

В статье обсуждаются особенности передачи парентеральных вирусных гепатитов В и С. В условиях Донбасса были проанализированы факторы риска вирусных гепатитов, которые используются в различных странах для определения групп риска по этим гепатитам.

Ключевые слова: скрининг, вирусные гепатиты, факторы риска

Вирусные гепатиты относятся к числу широко распространенных заболеваний. По приближенным оценкам в мире около 500 млн инфицированных гепатитами В и С, 1,8 млн из них ежегодно погибает от