

> patients with viral meningitis > erysipelas patients > patients with bacterial meningitis. Serum beta-lactamase activity in young and healthy persons is considerably higher than in sick individuals; in turn, this activity decreases in patients alongside with increase of disease severity and duration; thus, low level of serum beta-lactamase activity may be used as reliable ($p < 0,001$) independent prognostic factor of severe and/or propagated course of infectious diseases. Beta-lactamase activity of blood serum isn't a response of organism towards the exposure to beta-lactam antibiotics. Factor analysis enabled us to reveal the group of patients with severe course of pathologic processes accompanied by significant duration of antibacterial therapy, frequent replacement of antibiotics and frequent prescription of the reserve antibacterial preparations of all available groups, who had high level of beta-lactamase activity of blood serum.

Key words. *Beta-lactam antibiotics, antibiotic resistance, human blood serum, beta-lactamase activity, infectious diseases*

УДК 616-03:616-035.2

**Распад некоторых бета-лактамовых антибиотиков
под воздействием нативной сыворотки крови
и человеческого сывороточного альбумина**

**И.В. ЖИЛЬЦОВ, Д.В. МОИСЕЕВ,
В.М. СЕМЕНОВ, С.К. ЕГОРОВ**

*Витебский государственный медицинский университет,
Республика Беларусь*

Настоящая работа посвящена исследованию влияния ЧСА на бета-лактамы. Показано, что гидролиз четырех антибиотиков бета-лактамового ряда (бензилпенициллина, цефалексина, азтреонама и имипенема) под воздействием ЧСА статистически значительно ускоряется, что обуславливает дополнительный распад 2,3% азтреонама, 7,5% бензилпенициллина, 10,8% цефалексина и 11,9% имипенема к шестому часу инкубации при 37°C. При этом вид кинетических кривых распада бензилпенициллина, цефалексина и имипенема под воздействием ЧСА характерен для ферментативных реакций 1-го порядка, а азтреонама – нулевого порядка. Повышение температуры инкубации с 37°C до 39°C приводит к ускорению катализируемого альбумином распада имипенема в среднем на 14,0%, а цефалексина – на 15,7%. Бета-лактамовые антибиотики, не разрушающиеся под воздействием ЧСА, не разрушаются и цельной сывороткой крови. По отношению к бета-лактамовым антибиотикам, разрушаемым ЧСА, нативная сыворотка крови в некоторых случаях может проявлять существенно более высокую (для бензилпенициллина разница может превышать 30%) бета-лактамазную активность, чем очищенные препараты альбумина любого происхождения в нормальной для челове-

ческой крови концентрации. Таким образом, бета-лактамазная активность сыворотки крови распространяется не только на нитроцефин, но и на другие антибиотики бета-лактаманного ряда, широко используемые в практике здравоохранения.

Ключевые слова. *Бета-лактамы антибиотики, человеческий сывороточный альбумин, нативная сыворотка крови, бета-лактамазная активность, ВЭЖХ*

Феномен собственной бета-лактамазной активности человеческой крови известен достаточно давно. Так, было показано, что аналоги карбапенемов разрушаются альбуминами человеческой крови [1]. В 1972 г. группа исследователей компании Glaxo Research Ltd, изучая свойства синтезированного ими антибиотика нитроцефина, описала значимый распад бета-лактаманной связи последнего под воздействием, в числе прочего, сыворотки человеческой крови, причем было показано, что данное ее свойство опосредуется в первую очередь альбуминовой фракцией [2]. 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) [3, 4]. Попытка выявить распад некоторых других антибиотиков цефалоспоринового ряда под воздействием ЧСА не увенчалась успехом, и в результате феномен необычно высокой собственной бета-лактамазной активности человеческой крови остался незамеченным научным сообществом. В 2007 г. явление необычно интенсивного распада нитроцефина под воздействием сыворотки человеческой крови было независимо от других исследователей обнаружено нашим научным коллективом [5].

Ранее мы убедительно доказали, что бета-лактамазная активность – неотъемлемое свойство человеческой крови, и она на 86-100% обусловлена ее альбуминовой фракцией. Помимо ЧСА, большинство белковых фракций крови обладает незначительной бета-лактамазной активностью, составляющей приблизительно 9,6% от общей сывороточной. В частности, поликлональные IgG также обладают собственной бета-лактамазной активностью, но их вклад в общую сывороточную активность не превышает 10-15%. Нами был описан ряд особенностей сывороточной бета-лактамазной активности, в частности, оптимум pH, зависимость скорости реакции от температуры и ионной силы раствора, была изучена кинетика реакции распада нитроцефина, катализируемого ЧСА. Было также установлено, что наличие бета-лактамазной активности ЧСА критически зависит от сохранности третичной структуры последнего, и в то же время не зависит от присутствия кофакторов. Мы доказали наличие в составе молекулы альбумина

активного центра, ответственного за связывание бета-лактамовых антибиотиков и разрушение нитроцефина, смоделировали его трехмерную структуру и аминокислотный состав, а также реконструировали механизм катализа [6, 7]. Тем не менее, остается открытым вопрос – может ли ЧСА катализировать гидролиз бета-лактамовой связи каких-либо антибиотиков, кроме нитроцефина? Согласно имеющимся публикациям, такую возможность нельзя исключить [1], но конкретных данных о характере воздействия ЧСА на антибиотики бета-лактамового ряда нет до сих пор.

Соответственно, **целью настоящего исследования** было изучить взаимодействие ЧСА с антибиотиками бета-лактамового ряда из числа наиболее широко применяемых в клинической практике.

Материалы и методы

Определялась бета-лактамазная активность препарата ЧСА, очищенного спиртовой седиментацией по Кону [8] на Витебской областной станции переливания крови. Рабочая (в пробе) концентрация альбумина составляла 50 мг/мл.

Для исследования взаимодействия антибиотиков бета-лактамового ряда с сывороткой крови и ЧСА мы использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). Данный метод не позволяет непосредственно регистрировать факт распада бета-лактамовой связи антибиотика, фиксируя лишь убыль количества анализируемого вещества, но существуют способы обойти данное ограничение.

Для выполнения ВЭЖХ-анализа использовался жидкостный хроматограф Agilent 1100 с фотодиодным детектором G1315B и системой автоматического ввода пробы (автосэмплером). Разделение производилось на хроматографической колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 150×4,6 мм (размер частиц сорбента – 5 μm). В качестве подвижной фазы (элюента) применялась смесь ацетонитрила (пр-во Sigma) и 0,01 М КН₂РО₄ (рН 3,0), температура колонки составляла 30°C, давление в системе – 150–170 бар. Соотношение ацетонитрила и буферного раствора подбиралось таким образом, чтобы общее время одного анализа не превышало 15 минут, а время удерживания антибиотика составляло не менее 5 минут.

Для эксперимента было использовано 13 антибиотиков бета-лактамового ряда, все – химически чистые субстанции пр-ва Sigma либо Vetranal: азтреонам (CAS 78110-38-0), амоксициллин (CAS 26787-78-0), ампициллин (CAS 69-52-3), бензилпенициллин (CAS 69-57-8), имипенем (CAS 74431-23-5), пиперациллин (CAS 59703-84-3), цефалексин (CAS 15686-71-2), цефокситин (33564-30-6), цефоперазон (CAS 113826-44-1), цефотаксим (CAS 64485-93-4), цефтазидим (MDL MFCD00153936), цефтриаксон (CAS 104376-79-6),

цефепим (CAS 88040-23-7). Соотношение концентраций антибиотиков и ЧСА (во всех случаях 1 моль/л) составляло 1:1.

В качестве контрольных проб использовались рабочие растворы антибиотиков, разведенные в 2 раза 0,1 М ФБР, рН 7,4. Контрольные и опытные пробы инкубировались при 37°C в течение 3240 минут, причем содержание исследуемых антибиотиков в них замерялось перед началом инкубации, 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, после чего – на 1440, 1800, 2940 и 3240 минутах. По результатам замеров вычислялась доля антибиотика (в% от количества, исходно внесенного в пробу), содержащаяся в каждой паре проб на момент регистрации хроматограммы, и на основании полученных данных строились кривые убыли антибиотиков. Достоверность различий убыли антибиотиков в парах опытных и контрольных проб определялась при помощи F-теста с использованием программы GraphPad Prism 5.

Перед загрузкой смеси ЧСА с изучаемым антибиотиком на ВЭЖХ-колонку производилась депротеинизация раствора путем добавлением метанола (х.ч.) [9, 10].

Согласно полученным нами ранее данным [6, 7], повышение температуры до физиологически допустимых цифр, наблюдаемых у высоко лихорадящих больных (39-40°C), приводит к существенному повышению уровня гидролиза нитроцефина под воздействием ЧСА. Мы предположили, что данная закономерность распространяется не только на данную реакцию, но и на катализируемый ЧСА распад остальных бета-лактамных препаратов. С целью экспериментальной проверки указанного предположения было приготовлено две серии контрольных и опытных проб одинакового состава; одна серия инкубировалась при 37°C, вторая – при 39°C. В качестве субстратов были использованы химически чистые субстанции имипенема и цефалексина. Содержание антибиотиков в пробах определялось при помощи ВЭЖХ; в дальнейшем производилось сравнение количества антибиотиков, выявленного в опытных и контрольных пробах на определенный момент времени. Достоверность различий убыли антибиотиков в парах опытных и контрольных проб определялась с помощью F-теста.

Для доказательства факта распада бета-лактамной связи бензилпенициллина (БП) в процессе взаимодействия с ЧСА к рабочему раствору БП добавлялось 100 ЕД пенициллиназы (ФС 42-2059-92), затем производилось ВЭЖХ-определение количества БП в пробе непосредственно после внесения пенициллиназы и через 30 минут инкубации при комнатной температуре (22°C). Время удержания продуктов распада, образовавшихся вследствие воздействия пенициллиназы, в дальнейшем сравнивалось со

временем удержания продуктов распада, образовавшихся в результате взаимодействия БП и ЧСА.

Поскольку все вышеописанные эксперименты производились с очищенным препаратом ЧСА, возник вопрос о реальной доле вклада остальных белковых фракций сыворотки крови в ее суммарную бета-лактамазную активность. Данный вопрос уже поднимался ранее и был решен для реакции гидролиза нитроцефина: вклад глобулиновой фракции (и, в частности, поликлональных IgG) в суммарное количество разрушаемого нативной сывороткой крови нитроцефина в основном не превышает 10–15% [6, 7].

Тем не менее, ситуация с остальными бета-лактамами антибиотиками требует прояснения, поскольку ранее нами было доказано, что и механизм катализа, и кинетика реакции их распада могут существенно отличаться от таковых для нитроцефина. В связи с этим мы предприняли эксперимент по оценке вклада неальбуминовых фракций сыворотки крови в процесс гидролиза БП и цефтриаксона. Выбор пал на указанные антибиотики, поскольку ранее было строго доказано факт гидролиза бета-лактаманной связи БП под воздействием ЧСА, равно как и полное отсутствие гидролиза цефтриаксона в аналогичных условиях. Оба антибиотика чрезвычайно широко применяются в клинической практике в качестве средств для стартовой антибактериальной терапии и являются типичными представителями своих групп (природные пенициллины и парентеральные цефалоспорины 3-го поколения, соответственно). При изучении распада указанных бета-лактаманых антибиотиков под воздействием нативной сыворотки крови использовались 2 образца сыворотки, отличающиеся высокой собственной бета-лактамазной активностью (оба получены от больных с инфильтративным туберкулезом легких). Кроме того, для сравнения с ЧСА спиртовой очистки в данном эксперименте нами был использован препарат ЧСА особо высокой чистоты пр-ва «Sigma».

Результаты и обсуждение

Оказалось, что большая часть изученных антибиотиков (ампициллин, цефоперазон, пиперациллин, цефтазидим, цефтриаксон, цефотаксим и цефокситин) не взаимодействует с ЧСА – кривые их распада с течением времени в опытных (с альбумином) и контрольных (самораспад) пробах оказались практически идентичными, а разница между ними – статистически незначимой. В то же время, распад 4 антибиотиков (бензилпенициллина, цефалексина, азтреонама и имипенема) под воздействием ЧСА статистически значимо (во всех случаях $p < 0,0001$) ускорялся по сравнению со спонтанным распадом в контрольных пробах. Примечательно, что и имипенем, и азтреонам разрушаются лишь немногими бета-лактамазами бактерий, в

частности, карбапенемазами (имипенем), а также БЛРС, принадлежащими к функциональной группе 2be (азтреонам).

Графики убыли концентрации бензилпенициллина, цефалексина и имипенема в опытных пробах имеют экспоненциальный вид. Подобная форма кинетических кривых характерна для реакций 1-го порядка, типичных для истинных ферментов. В случае же азтреонама имеет место реакция нулевого порядка, скорость которой не зависит от концентрации субстрата, поскольку график убыли концентрации данного препарата имеет линейный вид.

По смоделированному нами процессу, к 6 часу с момента введения обсуждаемых антибиотиков в человеческий организм их взаимодействие с ЧСА приводит к гидролизу дополнительных (плюс к уровню самораспада) 2,3% азтреонама, 7,5% бензилпенициллина, 10,8% цефалексина и 11,9% имипенема. Таким образом, бета-лактамазная активность альбумина может обуславливать распад значимых количеств бета-лактамных препаратов, реально применяемых в клинической практике, тем самым снижая их клиническую эффективность.

Повышение температуры с 37°C до 39°C приводит к ускорению распада имипенема в среднем на 14,0% (максимальная разница – 33,3% – наблюдалась к 6 часу инкубации), а цефалексина – в среднем на 15,7% (данная разница оставалась практически неизменной на протяжении всего срока инкубации). Выявленные различия являлись статистически значимыми (для имипенема $p < 0,0001$, для цефалексина $p = 0,0016$). Напомним, что повышение температуры инкубации с 36°C до 39°C приводит к распаду дополнительных 11,5% нитроцефина; таким образом, полученные данные хорошо согласуются между собой [6, 7]. Можно заключить, что у лихорадящих больных с температурой тела 39°C и более распад бета-лактамных антибиотиков под воздействием ЧСА существенно ускоряется, что должно приводить к снижению их клинической эффективности и требует, как минимум, коррекции используемых доз в сторону увеличения.

Добавление 100 ЕД пенициллиназы к рабочему раствору БП 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 БП с ЧСА (также 2,7 минуты). Таким образом, можно считать доказанным, что при взаимодействии ЧСА и БП происходит гидролиз последнего по бета-лактамной связи, как и при воздействии пенициллиназ.

Анализ взаимодействия БП и цефтриаксона с нативной сывороткой крови показал, что: 1) цефтриаксон не разрушается под воздействием нативной сыворотки крови (как и под воздействием ЧСА); 2) нативная сыворот-

ка крови гидролизует БП существенно быстрее по сравнению с ЧСА; в среднем разница в уровнях бета-лактамазной активности сыворотки крови и чистого альбумина составила 12,2 процентных пункта в пользу сыворотки (U-тест Манна-Уитни, $p=0,0053$). Можно заключить, что нативная сыворотка крови в некоторых случаях демонстрирует бета-лактамазную активность, превышающую активность ЧСА (в нормальной для человеческой крови концентрации) до 32,5%, т.е. фактически на треть. Следует особо отметить, что активность обоих использованных в эксперименте препаратов ЧСА (полученного спиртовой седиментацией по Кону на Витебской областной станции переливания крови и особо высокой очистки пр-ва «Sigma») в отношении БП оказалась абсолютно идентичной. Убыль количества БП в пробах под воздействием нативной сыворотки крови носит экспоненциальный характер с постепенным выходом на плато (как и в случае с обоими препаратами ЧСА). Подобный вид кинетической кривой характерен для реакции первого порядка, типичной для пенициллиназ.

Выводы

1. С помощью метода ВЭЖХ доказано, что распад четырех антибиотиков бета-лактамного ряда (бензилпенициллина, цефалексина, азтреонама и имипенема) под воздействием ЧСА статистически значимо ускоряется по сравнению со спонтанным распадом в контрольных пробах. Согласно полученным нами данным, к шестому часу с момента введения перечисленных препаратов в организм человека их взаимодействие с ЧСА должно привести к гидролизу дополнительных (плюс к уровню самораспада) 2,3% азтреонама, 7,5% бензилпенициллина, 10,8% цефалексина и 11,9% имипенема. Таким образом, бета-лактамазная активность альбумина может обуславливать распад бета-лактамных антибиотиков, реально применяемых в клинической практике, тем самым снижая их клиническую эффективность.

2. Повышение температуры с 37°C до 39°C приводит к ускорению катализируемого альбумином распада имипенема в среднем на 14,0% (до 33,3% к 6 часу инкубации), а цефалексина – в среднем на 15,7%. Таким образом, у лихорадящих больных с температурой тела 39°C и выше распад бета-лактамных антибиотиков под воздействием ЧСА существенно ускоряется, что должно приводить к дополнительному снижению их клинической эффективности.

3. Бета-лактамные антибиотики, не разрушающиеся под воздействием ЧСА, не разрушаются и цельной сывороткой крови. По отношению к бета-лактамным антибиотикам, разрушаемым ЧСА, нативная сыворотка крови в некоторых случаях может проявлять существенно более высокую (для бензилпенициллина разница достигает 32,5%) бета-лактамазную активность, чем очищенные препараты альбумина любого происхождения в нормальной

для человеческой крови концентрации. Данная разница в активности определено обусловлена вкладом глобулиновых белковых фракций сыворотки крови.

Литература

1. An investigation of the destruction of the beta-lactam ring of penems by the albumin drug-binding site / H. Bruderlein [et al.] // Can. J. Biochem. – 1981. – Vol. 59, № 10. – P. 857–866.
2. Novel method for detection of b-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate / H.C. Callaghan [et al.] // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1972. – Vol. 1, № 4. – P. 283–288.
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. – Vol. 37, № 5. – P. 909–915.
4. Nerli B. Evidence of human serum albumin beta-lactamase activity / B. Nerli, G. Picó // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1994. – Vol. 32, № 4. – P. 789–795.
5. Необычно высокий уровень распада антибиотиков бета-лактаманной группы в человеческой плазме и сыворотке крови / И.В. Жильцов [и др.] // Материалы Евро-Азиатского Конгресса по инфекционным болезням. – Витебск, 2008. – Том 1. – С. 85–86.
6. Исследование природы бета-лактамазной активности сыворотки крови человека / И.В. Жильцов [и др.] // Сборник материалов конференции «Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации» (65-я научная сессия сотрудников ВГМУ, 24–25 марта 2010 г.). – Витебск, 2010. – С. 189–192.
7. Природа бета-лактамазной активности сыворотки крови / И.В. Жильцов [и др.] // Материалы Первого конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням. Журнал инфектол. – 2010. – Том 2, № 4. – С. 67–68.
8. Способы получения иммуноглобулинов для внутривенного введения и их клиническое применение / Н.П. Сивакова [и др.] // Трансфузиология. – 2008. – Том 9, № 1. – С. 4–12.
9. Moffat A.C. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. [Third edition] / Anthony C. Moffat, David M. Osselton, Brian Widdop // Pharmaceutical Press. – 2005. – 1248 p.
10. de Abreu L.R.P. HPLC determination of amoxicillin comparative bioavailability in healthy volunteers after a single dose administration / L.R.P. de Abreu, R.A.M. Ortiz // J. Pharm. Pharmaceut. Sci. – 2003. – Vol. 6, № 2. – P. 223–230.

Розпад деяких бета-лактаманних антибіотиків під впливом нативної сироватки крові і людського сироваткового альбуміну

І.В. ЖИЛЬЦОВ, Д.В. МОІСЄЄВ, В.М. СЕМЕНОВ, С.К. ЄГОРОВ

Справжня робота присвячена дослідженню впливу ЧСА на бета-лактами. Показано, що гідроліз чотирьох антибіотиків бета-лактаманного ряду (бензилпенициллина, цефалексину, азтреонама і іміпенема) під впливом ЧСА статистично значимо прискорюється, що обумовлює додатковий розпад 2,3% азтреонамом, 7,5% бензилпенициллина, 10,8% цефалексину та 11,9% іміпенема до шостого години інкубації при 37°C. При цьо-

му вигляд кінетики фазочеських кривих розпаду бензилпенициліну, цефалексину і іміпенему під впливом ЧСА характерний для ферментативних реакцій 1-го порядку, а азтреонамом – нульового порядку. Підвищення температури інкубації з 37°C до 39°C призводить до прискорення каталізованого альбуміном розпаду іміпенему в середньому на 14,0%, а цефалексину – на 15,7%. Бета-лактамі антибіотики, не руйнуються під впливом ЧСА, не руйнуються і метаної сироваткою крові. По відношенню до бета-лактамічних антибіотиків, руйнуються ЧСА, нативна сироватка крові в деяких випадках може виявляти істотно більш високу (для бензилпенициліну різниця може перевищувати 30%) бета-лактамазную активність, ніж очищені препарати альбуміну будь-якого походження в нормальній для чоловічеської крові концентрації. Таким чином, бета-лактамазная активність сироватки крові поширюється не тільки на нітроцефін, а й на інші антибіотики бета-лактамною ряду, широко використовуються в клінічній практиці.

Ключові слова. Бета-лактамі антибіотики, людський сироватковий альбумін, нативна сироватка крові, бета-лактамазная активність, ВЕРХ

Destruction some beta-lactam antibiotics by impact of whole blood serum and human serum albumin

I. ZHILTSOV, D. MOISEEV, V. SEMENOV, S. YEGOROV

The present work is dedicated to investigation of impact of human serum albumin (HSA) at beta-lactams. We have demonstrated that impact of HSA accelerates hydrolysis of 4 beta-lactams (namely, benzylpenicillin (BP), cefalexin, aztreonam and imipenem), and this acceleration is statistically reliable. It produces the additional destruction of 2,3% of aztreonam, 7,5% of BP, 10,8% of cefalexin and 11,9% of imipenem by the 6th hour of incubation at 37°C. Meanwhile, the appearance of kinetic curves of BP, cefalexin and imipenem decay is typical for enzymatic reactions of 1st order, but aztreonam one – for zero order. Increase of incubation temperature from 37°C to 39°C results in average acceleration of albumin-catalyzed imipenem decay by 14,0%, and that of cefalexin – by 15,7%. Beta-lactam preparations what are not destroyed by HSA also can't be degraded by the whole blood serum. If beta-lactam is capable of being hydrolyzed by HSA, native blood serum may show much higher beta-lactamase activity against it (above 30% of additional decay for BP) than any purified HSA preparations of any origin in concentrations what are normal for human blood serum. Thus, beta-lactamase activity of human blood serum extends to not only nitrocefirin, but also to other antibiotics of beta-lactam class what are widely used in health service practice what definitely is of a certain clinical importance.

Key words. Beta-lactam antibiotics, human serum albumin, native blood serum, beta-lactamase activity, HPLC