

ОСОБЕННОСТИ БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ РОЖЕЙ И ПНЕВМОНИЕЙ

ЖИЛЬЦОВ И.В., ВЕРЕМЕЙ И.С., СЕМЕНОВ В.М.,
ГЕНЕРАЛОВ И.И.

УО «Витебский государственный медицинский университет»

Резюме. 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 оценки уровня и частоты встречаемости выявленной активности, а также выявления ее возможной взаимосвязи с какими-либо патологическими состояниями.

Мы обследовали 31 больного рожей и 35 больных пневмонией, находившихся на лечении в Витебской областной инфекционной больнице в 2007/08 гг. Для определения наличия и уровня бета-лактамазной активности сыворотки крови использовался модифицированный нами неокупроинозный метод (А. Menashi, 1988). В качестве субстратов реакции применялись ампициллин и бензилпенициллина натриевая соль. Бета-лактамазная активность была выявлена у 94,29% (95% ДИ: 86,6-100) больных пневмонией, средний уровень распада внесенного в пробу антибиотика за 20 минут инкубации составил 51,38% для ампициллина и 81,76% для бензилпенициллина. У больных рожей частота встречаемости бета-лактамазной активности крови оказалась равной 92,86% (95% ДИ: 83,32-100), причем средний уровень распада внесенных в пробу антибиотиков составил 50,73% для ампициллина и 75,42% для бензилпенициллина. Статистически значимых межгрупповых различий выявлено не было.

Полученные нами результаты указывают на то, что значительная часть устойчивости к бета-лактамам препаратам, наблюдаемой клиницистами, может быть обусловлена наличием в крови больных определенных факторов, обладающих пенициллиназной активностью.

Ключевые слова: Бета-лактамазная активность, сыворотка крови, рожа, пневмония, природные- и аминопенициллины, неокупроинозный метод.

Abstract. Bacterial antibiotic resistance is known to be one of the most challenging problems of modern infectology, but this phenomenon is still analyzed from the side of bacteria only.

Examining human blood serum for the presence of catalytic antibodies (abzymes) we accidentally found uncommonly high level of penicillinase activity, significantly higher than that expressed by polyclonal IgG studied before (I. Zhiltsov, 2001). Thus, our study was undertaken to assess the blood serum activity found and to associate it with some pathological conditions. We examined 31 patients with erysipelas and 35 patients with pneumonia treated at the Vitebsk Regional Infectious Hospital in 2007/08.

To determine the presence and level of beta-lactamase activity of blood serum, we applied modified neocuproine technique (A. Menashi, 1988), ampicillin and penicillin G were used as substrates. Beta-lactamase activity was found in 94,29% (95% CI: 86,6-100) of all pneumonia cases (the average level of antibiotic destruction for 20 minutes of incubation made up 51,38% for ampicillin and 81,76% for penicillin G). Beta-lactamase activity was also revealed in 92,86% (95% CI: 83,32-100) of erysipelas cases (the average level of destruction made up 50,73% for ampicillin and 75,42% for penicillin G). No reliable differences between two groups were found.

The obtained results indicate that a considerable part of penicillinase activity observed in clinical conditions may be explained by some properties of human blood.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, кафедра инфекционных болезней, тел 24-33-46 – Жильцов И.В.

Антибиотикоустойчивость бактерий на текущий момент является одной из наиболее важных и актуальных проблем инфектологии.

Практически все известные науке бактерии – возбудители инфекционных заболеваний (за редким исключением) в большей или меньшей степени проявляют устойчивость к тем или иным антибактериальным препаратам.

Основным механизмом устойчивости бактерий к бета-лактамам является синтез разнообразных бета-лактамаз. В то же время, сам макроорганизм небезразличен 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 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-лактамов 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 нарушение 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. Например, 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-лактамовых 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 обладали. Следует отметить, что в данном случае бета-лактамовая связь не разрушается, из-за чего цефалоспорины, не содержащие 3-ацетоксиметильной группы (цефалоридин, цефалексин, цефамандол, цефазолин), не утрачивали активности в присутствии гемолизированной крови [8].

Данное наблюдение показывает, что антибиотики бета-лактамового 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]. Более того, давно известно, что карбапенемы (в частности, имипенем) разрушаются почечными дегидропептидазами, причем продукты распада нейротоксичны для некоторых млекопитающих; именно поэтому в состав коммерческого препарата имипенема был введен ингибитор почечных дегидропептидаз циластатин [9].

Обнаружение в крови больных факторов (возможно, нескольких), эффективно разрушающих бета-лактамовые 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 сыворотки человеческой крови. Для этого мы выбрали две категории доступных для обследования больных - с рожистым воспалением («рожей») и бактериальной пневмонией; при этом мы отталкивались от того факта, что указанные категории больных всегда получают длительную антибактериальную терапию, причем в схему указанной терапии почти всегда входит тот или иной бета-лактамный препарат. Рожа, кроме того, склонна к рецидивирующему течению, виду чего такие больные получают пенициллины либо цефалоспорины неоднократно в течение жизни.

В этой связи в крови указанных больных можно было ожидать наиболее высокий уровень β -лактамазной активности, превышающий таковой в генеральной совокупности.

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 фибринового сгустка; использовалось центрифугирование в угловой центрифуге при 3000 об/мин в течение 15 минут. Полученная сыворотка крови сохранялась до момента эксперимента в морозильной камере при -20°C; допускалось только однократное размораживание пробы непосредственно перед экспериментом. Пробы с визуальными признаками гемолиза исключались из эксперимента.

2. Методика определения бета-лактамазной активности

Бета-лактамазная активность сыворотки крови определялась посредством модифицированного неокупроинового метода [10].

Все используемые реагенты имели квалификацию не ниже ч.д.а. Измерение оптических плотностей проводили на спектрофлуориметре SOLAR-CM2203, (гос. рег. № РБ 03 11 2864 06) в режиме спектрофотометрии.

В качестве субстратов для определения каталитической активности сыворотки крови мы использовали бензилпенициллина натриевую соль и ампициллина тригидрат (химически чистые субстанции производства Sigma).

0,15 мл раствора каждого из двух упомянутых антибиотиков в концентрации 0,18 мг/мл 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 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 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 предварительно полностью гидролизованных кипячением с 0,2 М гидроокисью натрия антибиотиков вносили в испытуемые сыворотки в количестве, аналогичном опытными пробам, и далее проводили депротеинизацию, как указано выше.

Затем к исследуемым растворам прибавляли 0,2 мл ацетатного буфера ($\text{pH}=4,75$), 0,2 мл неокупроинового реагента и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут до развития стабильной желтой окраски. Спустя указанное время измеряли оптическую плотность образовавшихся комплексов при 454,5 нм. При этом длина оптического пути составляла 10 мм.

В дальнейшем определялась доля антибиотика, распавшегося в пробе за время инкубации, как отношение ОП в опытной пробе к ОП соответствующей контрольной пробы с полностью распавшимся антибиотиком (ампициллином либо бензилпенициллином). Вычисленное значение выражалось в процентах.

3. Дизайн исследования

Дизайн собственно исследования – срезовое (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).

4. Клиническая характеристика больных, вошедших в исследование

В данное исследование были включены 66 человек, находившихся на лечении в диагностическом отделении Витебской областной инфекционной клинической больницы (УЗ ВОИКБ) с 2005 по 2008 гг.

Данные больные были разделены на 2 группы: 31 человек с клиническим диагнозом «рожистое воспаление» (далее «рожа») и 35 человек с подтвержденным рентгенологически диагнозом «пневмония».

Средний возраст больных в указанных группах, а также соотношение мужчин и женщин в каждой из групп показано в таблице 1.

Таблица 1

Распределение обследованных больных по возрасту и полу

Показатель		Вся группа	Рожа	Пневмония
В целом	к-во (%)	n=66	n=31	n=35
	средн. возраст (95% ДИ)	49,9 лет 95% ДИ: 45,4-54,4	58,0 лет 95% ДИ: 51,5-64,5	42,9 лет 95% ДИ: 37,4-48,4
Мужчины	к-во (%)	n=24 (36,4%)	n=12 (38,7%)	n=12 (34,3%)
	средн. возраст (95% ДИ)	49,04 лет 95% ДИ: 42,5-55,6	55,8 лет 95% ДИ: 45,2-66,3	42,8 лет 95% ДИ: 35,1-50,6
Женщины	к-во (%)	n=42 (63,6%)	n=19 (61,3%)	n=23 (65,7%)
	средн. возраст (95% ДИ)	50,4 лет 95% ДИ: 44,2-56,6	59,4 лет 95% ДИ: 50,4-68,5	43,0 лет 95% ДИ: 35,1-50,8

Из таблицы 1 видно, что соотношение мужчин и женщин во всех исследуемых группах больных составляет приблизительно 1:2, средний возраст мужчин и женщин в пределах групп не различается, основу группы больных рожистым воспалением составляют пожилые лица (средний возраст 58 лет), основу группы больных пневмонией - лица среднего возраста (средний возраст 43 года), что отражает естественную эпидемиологию данных заболеваний.

У 31 больного наблюдалось легкое течение заболевания (рожа – 16, пневмония – 15), у 23 – среднетяжелое течение (рожа – 13, пневмония – 10), и у 13 больных – тяжелое течение (рожа – 2, пневмония – 11).

Все больные, вошедшие в исследование, получали антибактериальную терапию.

В группе больных рожей преобладало назначение бензилпенициллина (64,5% больных, средняя длительность курса лечения 6 сут), в группе больных пневмонией – назначение цефотаксима (85,7% больных, средняя длительность курса лечения 11 сут).

Ампициллин в группе больных рожей получало 3 человека (9,67%), в группе больных пневмонией – 5 человек (14,3%). Бензилпенициллин в группе больных пневмонией получало 2 человека (5,71%).

5. Статистический анализ результатов исследования

Статистический анализ результатов исследования был выполнен с использованием аналитического пакета Statistica 7.0 (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), а при анализе малых групп – точный тест Фишера (Fisher's exact test). 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).

Результаты исследования

1. Частота встречаемости пенициллиназной активности сыворотки крови у больных в исследуемых группах, особенности выявленной активности

Ускоренное разрушение ампициллина было выявлено в 59 случаях из 63 проанализированных (в 4 случаях уровень распада ампициллина в экспериментальных пробах достоверно не отличался от уровня самораспада антибиотика в контрольных пробах), что составляет 93,65% (95% ДИ: 87,63-99,67).

Ускоренное разрушение бензилпенициллина было выявлено в 63 случаях из 65 проанализированных (в 2 случаях уровень распада бензилпенициллина в экспериментальных пробах достоверно не отличался от уровня самораспада антибиотика в контрольных пробах), что составляет 96,92% (95% ДИ: 92,72-100).

При этом у 5 больных уровень распада ампициллина оказался менее 20% от внесенного в пробу препарата (7,93%, 95% ДИ: 1,26-14,61), у 12 – в интервале 20-39% (19,05%, 95% ДИ: 9,35-28,74), у 21 – в интервале 40-59% (33,33%, 95% ДИ: 21,69-44,97), у 10 – в интервале 60-79% (15,87%, 95% ДИ: 6,85-24,9), и у 11 – в интервале 80-100% (17,46%, 95% ДИ: 8,09-26,83).

Соответственно, лишь у 1 больного уровень распада бензилпенициллина оказался менее 20% от внесенного в пробу препарата (1,54%, 95% ДИ: 0-4,53), у 2 – в интервале 20-39% (3,08%, 95% ДИ: 0-7,28), у 2 – в интервале 40-59% (3,08%, 95% ДИ: 0-7,28), у 23 – в интервале 60-79% (35,38%, 95% ДИ: 23,76-47,01), и у 35 – в интервале 80-100% (53,85%, 95% ДИ: 41,73-65,97).

В целом, можно отметить, что у большинства больных отмечается средний уровень распада ампициллина, и одновременно высокий уровень распада бензилпенициллина в сыворотке крови (рисунок 1); впрочем, тот или иной уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови был выявлен практически у всех больных.

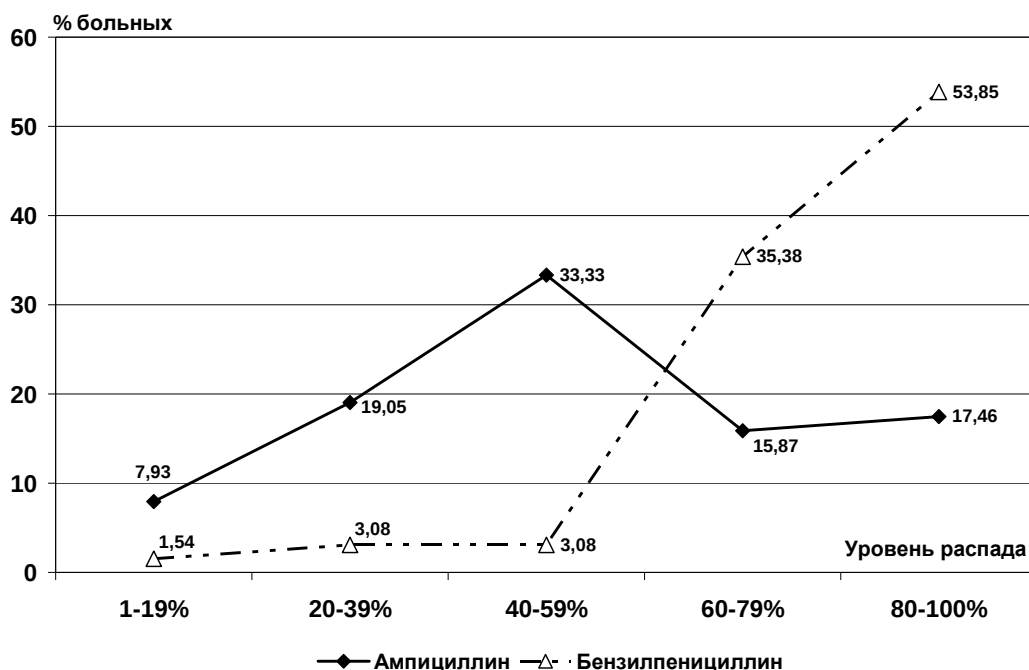


Рис. 1. Уровень бета-лактамазной активности у исследуемых больных в целом (отдельно для ампициллина и бензилпенициллина).

Соответствующие уровни распада бензилпенициллина и ампициллина в группах больных рожей и пневмонией по отдельности приведены в таблицах 2, 3. Частоты встречаемости повышенного (>0) распада ампициллина в группах больных рожей и пневмонией достоверно не различались (точный тест Фишера, односторонний $p=0,60$).

Частоты встречаемости повышенного (>0) распада бензилпенициллина в группах больных рожей и пневмонией также достоверно не различались (точный тест Фишера, односторонний $p=0,21$). Не было выявлено и достоверных межгрупповых различий между уровнями бета-лактамазной активности в группах больных рожей и пневмонией (точный тест Фишера, односторонний $p=0,063...0,71$).

Тем не менее, различия между уровнями распада ампициллина и бензилпенициллина оказались весьма значительными, как среди больных в целом, так и в группах больных рожей и пневмонией. Так, средний уровень распада ампициллина в группе больных рожей составил 50,73% (95% ДИ: 39,16-62,3), а распада бензилпенициллина – 75,42% (95% ДИ: 64,07-86,78), разница статистически значима, $p<0,001$.

Соответственно, средний уровень распада ампициллина в группе больных пневмонией оказался равен 51,38% (95% ДИ: 43,26-59,5), а распада бензилпенициллина – 81,76% (95% ДИ: 75,39-88,13), разница статистически значима, $p<0,0000001$. Для выявления достоверности различий использовался U-тест Манна-Уитни. Соответственно, можно отметить закономерно более высокий уровень распада бензилпенициллина в сыворотке крови больных из всех изучаемых групп по сравнению с уровнем

распада ампициллина; причина этого явления в настоящее время неясна и требует дальнейшего уточнения.

Таблица 2

**Уровень распада ампициллина в сыворотке крови больных
рожей и пневмонией**

Уровень распада ампициллина	Рожа (n=28)	Пневмония (n=35)
0% (распад отсутствовал)	2 (7,14%) 95% ДИ: 0-16,68	2 (5,71%) 95% ДИ: 0-13,4
1-19%	4 (14,29%) 95% ДИ: 1,32-27,25	1 (2,86%) 95% ДИ: 0-8,38
20-39%	5 (17,86%) 95% ДИ: 3,67-32,04	7 (20%) 95% ДИ: 6,75-33,25
40-59%	6 (21,43%) 95% ДИ: 6,23-36,63	15 (42,86%) 95% ДИ: 26,46-59,25
60-79%	5 (17,86%) 95% ДИ: 3,67-32,04	5 (14,29%) 95% ДИ: 2,69-25,88
80-100%	6 (21,43%) 95% ДИ: 6,23-36,63	5 (14,29%) 95% ДИ: 2,69-25,88
Всего:	26 (92,86%) 95% ДИ: 83,32-100	33 (94,29%) 95% ДИ: 86,60-100

Таблица 3

**Уровень распада бензилпенициллина в сыворотке крови больных
рожей и пневмонией**

Уровень распада бензилпенициллина	Рожа (n=30)	Пневмония (n=35)
0% распад отсутствовал	2 (6,67%) 95% ДИ: 0-15,59	0
1-19%	1 (3,33%) 95% ДИ: 0-9,76%	0
20-39%	1 (3,33%) 95% ДИ: 0-9,76%	1 (2,86%) 95% ДИ: 0-8,38
40-59%	1 (3,33%) 95% ДИ: 0-9,76%	1 (2,86%) 95% ДИ: 0-8,38
60-79%	10 (33,33%) 95% ДИ: 16,46-50,2	13 (37,14%) 95% ДИ: 21,13-53,15
80-100%	15 (50%) 95% ДИ: 32,11-67,89	20 (57,14%) 95% ДИ: 40,75-73,54
Всего:	28 (93,33%) 95% ДИ: 84,41-100	100%

2. Взаимосвязь уровней выявленной бета-лактамазной активности и клинико-лабораторных показателей, характеризующих течение рожи и пневмонии. В процессе анализа взаимосвязей уровней выявленной бета-лактамазной активности и клинико-лабораторных показателей, характеризующих течение рожи и пневмонии (метод ранговых корреляций Спирмена, гамма-корреляция), были выявлены следующие корреляции, представляющие клинико-патогенетический интерес (таблица 4).

Таблица 4

Выявленные корреляционные взаимосвязи между наличием и уровнем бета-лактамазной активности крови и клинико-лабораторными показателями

Коррелирующие факторы	Коэффициент корреляции	Показатель вероятности нулевой гипотезы (p)	Метод вычисления корреляционной зависимости
Уровень распада ампициллина и уровень распада бензилпенициллина	+0,68	<0,005	Гамма
Уровень распада ампициллина и факт назначения ампициллина больному	+0,71	<0,05	Гамма
Уровень распада ампициллина и продолжительность лечения ампициллином	+0,66	<0,05	Гамма
Уровень распада бензилпенициллина и концентрация общего белка крови	-0,55	<0,05	Спирмена
Уровень распада бензилпенициллина и концентрация общего/прямого билирубина в крови	+0,9...1,0	<0,05	Спирмена, гамма
Уровень распада бензилпенициллина и концентрация мочевины в крови	+0,51	<0,05	Спирмена

Прямая корреляция средней силы между уровнями распада ампициллина и бензилпенициллина указывает на общность факторов, катализирующих распад обоих антибиотиков, и, возможно, на общность собственно механизмов катализа.

Наличие зависимости между уровнем распада ампициллина в крови и фактом назначения ампициллина данному больному, а также продолжительностью лечения ампициллином свидетельствует о том, что повышенный распад ампициллина в крови больных может быть ответной реакцией организма на длительное назначение данного антибиотика и, соответственно, опосредоваться каким-либо индуцибельным фактором.

Обратная корреляция между уровнем бета-лактамазной активности крови и концентрацией общего белка в крови косвенно указывает на то, что фактор, ответственный за проявление каталитических свойств, низкомолекулярный, и, связываясь с белками крови, частично либо полностью утрачивает свою активность.

Наличие сильной прямой коррелятивной зависимости между уровнем распада бензилпенициллина в крови и концентрацией общего, прямого билирубина и мочевины, возможно, указывает на конкретные низкомолекулярные вещества, которые (не исключено, что в комплексе с альбуминами крови) могут оказаться способны осуществлять специфический катализируемый распад антибиотиков бета-лактамной группы. Данное предположение требует обязательной экспериментальной проверки.

Анализ с использованием U-теста Манна-Уитни показал, что уровень распада бензилпенициллина несколько выше в крови мужчин ($p=0,04$).

Уровень распада ампициллина оказался достоверно выше в крови лиц, получавших ампициллин в ходе антибактериальной терапии ($p=0,049$).

Никаких иных достоверных различий частоты встречаемости и уровня бета-лактамазной активности сыворотки крови в зависимости от значений каких-либо еще существенных клинико-лабораторных показателей выявлено не было.

3. Возможная практическая значимость выявленного феномена

В этом разделе мы представили очень приблизительный анализ вклада обнаруженного и описанного нами явления в общую структуру разрушения изученных бета-лактамных антибиотиков (ампициллина и бензилпенициллина) в процессе их циркуляции в крови. В частности, с учетом того, что:

1) объем циркулирующей крови у взрослого человека составляет около 5 литров,

2) и ампициллин, и бензилпенициллин назначаются парентерально по 1-1,5 грамма препарата 4 раза в сутки (4-6 раз в сутки для пенициллина), и, соответственно, период активной циркуляции препарата в крови составляет 4-6 часов, то концентрация обоих препаратов в крови непосредственно

после инъекции составляет около 0,2-0,3 мг/мл, что хорошо соотносится с использованной нами в эксперименте концентрацией указанных антибиотиков (0,18 мг/мл).

Таблица 5

Выявленные корреляционные взаимосвязи между наличием и уровнем бета-лактамазной активности крови и клинико-лабораторными показателями

Коррелирующие факторы	Коэффициент корреляции	Показатель вероятности нулевой гипотезы (p)	Метод вычисления корреляционной зависимости
Уровень распада ампициллина и уровень распада бензилпенициллина	+0,68	<0,005	Гамма
Уровень распада ампициллина и факт назначения ампициллина больному	+0,71	<0,05	Гамма
Уровень распада ампициллина и продолжительность лечения ампициллином	+0,66	<0,05	Гамма
Уровень распада бензилпенициллина и концентрация общего белка крови	-0,55	<0,05	Спирмена
Уровень распада бензилпенициллина и концентрация общего/прямого билирубина в крови	+0,9...1,0	<0,05	Спирмена, гамма
Уровень распада бензилпенициллина и концентрация мочевины в крови	+0,51	<0,05	Спирмена

Можно предположить, что при выявленном нами среднем уровне распада ампициллина в 51% и бензилпенициллина в 79% от исходно введенного (за 20 минут инкубации при 37°C) концентрация обоих

антибиотиков в крови существенно снижается за небольшой (не более 1 часа) срок с момента их парентерального введения, что подчеркивает практическую значимость обнаруженного и описанного феномена: при идентификации фактора (или нескольких), ответственных за проявление столь высокой собственной бета-лактамазной активности крови, и нахождении способа его (их) эффективного ингибирования можно было бы радикально снизить используемые в клинической практике дозировки бета-лактамов, что повлекло бы за собой как существенную экономию средств, ассигнуемых на этиотропную терапию, так и заметное сокращение частоты побочных эффектов лечения.

Заключение

1. Не вызывает сомнения, что кровь больных как рожей, так и пневмонией способна осуществлять эффективный специфический (по бета-лактамовой связи) гидролиз бета-лактамовых антибиотиков. Степень выраженности бета-лактамазной активности сыворотки крови не зависит от пола, возраста больных и характера заболевания.

2. Уровень описанной собственной бета-лактамазной активности крови достаточен для существенного снижения концентрации исследованных антибиотиков в крови за время их эффективной циркуляции (вплоть до полного распада), что указывает на большую практическую значимость обнаруженного феномена.

3. Природа факторов, опосредующих указанную активность крови, остается неизвестной. Тем не менее, получены косвенные указания на то, что данные факторы являются низкомолекулярными веществами (прямой и общий билирубин, мочевины), возможно, проявляющими свою бета-лактамазную активность в комплексе с альбуминами. При этом катализируемый распад ампициллина и бензилпенициллина осуществляется одними и теми же факторами и по сходному механизму.

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, распознав фактор (или факторы), ответственный за аномально высокий распад бета-лактамов в крови, и разработав эффективную методику его/их 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 эмпирическую антибактериальную терапию. Помимо этого, в случае выявления высокой бета-лактамазной активности крови возможно изменение проводимой конкретному больному антибактериальной 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 теоретический и практический интерес для клиники инфекционных болезней.

Литература

1. Особенности «биологической» антибиотикоустойчивости при шигеллезах: выявление *in vivo* поликлональных IgG, обладающих пенициллиназной активностью / И. В. Жильцов [и др.] // Медицинская панорама. – 2006. – №5 (62). – С. 46-48.
2. Jerne, N. K. Towards a network theory of the immune system / N. K. Jerne // Ann. Immunol. (Inst.Pasteur). – 1974. – Vol. 125, № 1-2. – P. 373-389.
3. 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 / M. Shirley Palmer [et al.] // Antimicrobial Agents And Chemotherapy. – 1995. – Vol. 39, N 8. – P. 1764-1771.
4. 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) / R. Rogers Yocum [et al.] // Biochemistry. – 1979. – Vol. 76, № 6. – P. 2730-2734.
5. Blumberg, P. M. Interaction of Penicillin with the Bacterial Cell: Penicillin-Binding Proteins and Penicillin-Sensitive Enzymes / M. Peter Blumberg, L. Jack Strominger // Bacteriological Reviews. – 1974. – Vol. 38, N 3. – P. 291-335.
6. Страчунский, Л. С. Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей / под ред. Л. С. Страчунского, С. Н. Козлова. – М.: Боргес, 2002. – 432 с.
7. Livermore, D. M. b-lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. / D. M Livermore // Antibiotics in laboratory medicine / ed. V. Lorian D.M. –. Williams Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. – P. 503-578.
8. Walter, E. Hydrolysis of 3-Acetoxymethyl Cephalosporins by Lysed WholeBlood / E. Walter Wright, A. Judith Frogge // Antimicrobial Agents And Chemotherapy. – 1980. – Vol. 17, N 1. – P. 99-100.
9. Moellering, R. C. The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics / R. C. Moellering, G. M. Eliopoulos, D. E. Sentochnik // J. Antimicrob. Chemother. – 1989. – Vol. 24. – Suppl. A. – P. 1-7.
10. Menashi, A. C. A colorimetric procedure for measuring b-lactamase activity / A. C. Menashi, J. Abraham, A. M. Antone Menashi // Analytical Biochemistry. – 1988. – Vol. 168. – P. 252-258.