«Метод шахматной доски» как тест для оценки снижения уровня резистентности грамотрицательных микроорганизмов к карбапенемам в присутствии бисфосфоната

А. Г. Афиногенова[1], Т. М. Ворошилова[2], Г. Е. Афиногенов[1], Г. Г. Родионов[2]

[1] *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

[2] *Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия*

Одним из основных механизмов резистентности грамотрицательных микроорганизмов к антимикробным препаратам является ферментативный гидролиз бета-лактамазами (в частности, металло-бета-лактамазы). Одним из путей усиления действия карбапенемов является их сочетанное применение с препаратами, ингибирующими действие металло-бета-лактамаз, независимо от генотипа ферментов и их локализации, в частности лекарственными средствами из группы бисфосфонатов, разрешенными для применения в клинике. Впервые в наших исследованиях показано, что сочетанное применение меропенема или имипенема с препаратом «Бонефос» (клодроновая кислота) усиливает действие соответствующего антибиотика в 4–1024 раза. Данный эффект выявлен у бисфосфоната в концентрациях ниже МПК карбапенемов в 2÷64 раза, которые оказались в 2÷68 раз меньше максимальной концентрации этого препарата в сыворотке крови через 30 мин после перорального приема однократной дозы. Сочетанное применение карбапенемов и бисфосфонатов позволит клиницистам добиться эффективной терапии тяжелых инфекций, вызванных грамотрицательными высокорезистентными бактериями, продуцирующими металло-бета-лактамазы.

Ключевые слова: карбапенемы, бета-лактамазы, бисфосфонаты, метод шахматной доски, антибиотикорезистентность.

«Checkerboard Array» as a Test for Evaluation of Decrease in Gram-Negative Bacteria Resistance to Carbapenems in the Presence of Bisphosphonate

A. G. Afinogenova[1], T. M. Voroshilova[2], G. E. Afinogenov[1], G. G. Rodionov[2]

[1] *Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

[2] *The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russia*

One of the main mechanisms of resistance of Gram-negative microorganisms to antibiotics is enzymatic hydrolysis by beta-lactamases (for example, metallo-beta-lactamases). Searching of paths of strengthening of carbapenems action is possible due to their combined application with the preparations inhibiting the action of metallo-beta-lactamases, irrespective of a genotype of enzymes and their localization (for example, among pharmaceuticals from group of bisphosphonates, allowed for application in clinic). For the first time in our researches it is shown that the combined application of meropenem or imipenem with the preparation «Bonefos» (clodronic acid) strengthens action of the corresponding antibiotic from

Контактный адрес:
Анна Геннадьевна Афиногенова
Эл. почта: spbtestcenter@mail.ru

4 to 1024 times. This effect is revealed at bisphosphonate in concentration from 1/2 MIC to 1/64 MIC which appeared up to 68 times less maximal concentration of this preparation in blood serum in 30 minutes after per os single-pass dose. The combined application of carbapenems and bisphosphonates will allow clinical physicians to achieve efficient therapy of the heavy infections caused by Gram-negative high-resistance bacteria producing metal-beta-lactamases.

Key words: carbapenems, beta-lactamases, bisphosphonates, checkerboard array, antimicrobial resistance.

Введение

В настоящее время у пациентов, находящихся на стационарном лечении, наблюдается увеличение доли грамотрицательных аэробных бактерий как возбудителей инфекций [1]. Речь идет о *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter* spp., *Klebsiela* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* и др. Эти микроорганизмы, как правило, обладают низкой чувствительностью к различным классам антибиотиков, а также способностью приобретать резистентность в процессе лечения, что представляет существенные проблемы при проведении антибактериальной терапии и резко ограничивает арсенал применяемых для лечения больных антибактериальных препаратов, в том числе карбапенемов. Устойчивость среди *Enterobacteriaceae* обусловлена комбинацией нескольких механизмов, например гиперпродукцией бета-лактамаз и снижением проницаемости внешней мембраны микробной клетки (обычно это связано с утратой пориновых белков). Все известные в настоящее время бета-лактамазы делят на четыре молекулярных класса, в пределах которых ферменты характеризуются общностью свойств и определенной аминокислотной гомологией. Бета-лактамазы классов A, C, D относятся к ферментам «серинового» типа (по аминокислоте, находящейся в активном центре фермента). Ферменты класса B относятся к *металло-бета-лактамазам* (МβЛ), поскольку в качестве ко-энзима в них присутствует цинк (Zn^{2+}) [2] .

Ранее были проведены исследования МβЛ у грамотрицательных бактерий с помощью *этилендиаминтетраацетата* (ЭДТА) [1]. Этот тест показывает способность ЭДТА ингибировать МβЛ у грамотрицательных бактерий, что проявляется в расширении зон задержки роста вокруг диска с карбапенемом. Синтез бета-лактамаз грамотрицательными бактериями и возникшая в этой связи их устойчивость к бета-лактамным антибиотикам очень часто не может быть определена традиционными, привычными для лабораторной службы клинических учреждений фенотипическими методами — методом дисков и методом серийных разведений. Есть специальные методы, но далеко не все из них стандартизированы и в большинстве случаев не получили формального признания, не «узаконены» [3]. Сравнительно высокая токсичность ЭДТА и легкость проникновения внутрь клетки ограничивают его применение в лечебной практике. В связи с этим несомненный интерес могут представлять нетоксичные хелатообразующие лекарственные препараты, разрешенные к клиническому применению.

Целью нашего исследования было изучение возможности усиления действия карбапенемов в отношении резистентных грамотрицательных микроорганизмов с помощью лекарственного препарата «Бонефос» из группы бисфосфонатов.

Ранее в наших исследованиях методом «двойных дисков с ЭДТА» [1] выявлена хелатирующая активность веществ из группы бисфосфонатов, которая не уступала таковой у ЭДТА в отношении штамма *P. aeruginosa* — продуцента МβЛ [4]. Наиболее признанным по изучению эффекта сочетанного действия антибиотиков является так называемый «метод шахматной доски» [3, 5, 6], который был использован в нашей работе.

Материал и методы

Стандартными методами [7,8] были выделены 20 изолятов грамотрицательных микроорганизмов из клинического материала пациентов (кровь, ликвор, мокрота, раневое отделяемое, моча) клиники № 2 ФГБУ ВЦЭРМ им. А. М. Никифорова МЧС России. Идентификацию проводили на бактериологическом анализаторе VITEK-2 (Биомерье, Франция). Уровень резистентности выделенных изолятов определяли методом серийных разведений в бульоне Мюллера–Хинтон (OXOID) с определением *минимальных подавляющих концентраций* (МПК) антибиотиков [9]. Фенотипическую детекцию МβЛ тест-штаммов с высоким уровнем резистентности к карбапенемам проводили с помощью Е-теста (имипенем и имипенем + ЭДТА, Биомерье, Франция). Методом ПЦР проводили генотипирование карбапенемаз у всех штаммов грамотрицательных микроорганизмов с использованием приборов Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), CFX96 (Bio-Rad, США) и наборов реагентов для выделения генов карбапенемаз «АмплиСенс» (предоставлены ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). В работе использовали бисфос-

Таблица 1. **Уровень резистентности к карбапенемам у грамотрицательных микроорганизмов в зависимости от генотипа карбапенемаз**

№ п/п	№ штамма	Тест-микроорганизм	МПК антибиотика, мкг/мл		Генотип карбапенемазы
			меропенем	имипенем	
1	346/14	*A. baumannii*	128	256	OXA-40
2	947/12	*A. baumannii*	64	128	OXA-40
3	2847	*A. baumannii*	128	32	OXA-40
4	4459/13	*A. baumannii*	32	32	OXA-23
5	598/13	*A. baumannii*	64	32	OXA-40
6	798/12	*A. baumannii*	128	128	OXA-40
7	965/12	*A. baumannii*	16	16	OXA-23
8	807/12	*A. baumannii*	32	64	OXA-40
9	944/12	*A. baumannii*	32	64	OXA-40
10	792/12	*A. baumannii*	64	64	OXA-40
11	4459/13	*A. baumannii*	16	32	OXA-23
12	193	*A. baumannii*	16	8	OXA-23
13	2474/14	*A. baumannii*	32	32	OXA-40
14	532/14	*P. aeruginosa*	512	512	VIM
15	53/14	*P. aeruginosa*	512	512	VIM
16	827	*P. aeruginosa*	32	128	VIM
17	2314	*P. aeruginosa*	16	16	VIM
18	2365/14	*P. aeruginosa*	32	128	VIM
19	886	*K. pneumoniae*	16	8	NDM
20	4058/13	*K. pneumoniae*	128	128	NDM

фонат «Бонефос» (клодроновая кислота) и ЭДТА в качестве контроля.

Изучение усиления действия карбапенемов (имипенема и меропенема) в сочетании с ЭДТА или Бонефосом проводили «методом шахматной доски». В исследованиях использовали микроразведения в полистироловых 96-луночных планшетах (ОАО «Медполимер», Россия). Для данного исследования готовили раствор ЭДТА с содержанием 50 мг препарата в 1 мл стерильной дистиллированной воды, далее в среде Мюллера–Хинтон получали 2-кратные разведения. В ячейки, содержащие по 100 мкл разведения антибиотиков, вносили по 100 мкл разведений ЭДТА, объем смеси составил 200 мкл. При этом в ряду А2 — А8 содержалось по 200 мкл разведений ЭДТА, тогда как в ряду Б1 — З1 содержалось по 200 мкл разведений антибиотика. Ячейка А1 — контроль культуры 200 мкл, ячейка З8 — контроль среды 200 мкл. Аналогичным способом готовили разведения препарата Бонефос.

Исследования проводили с тест-культурами *P. aeruginosa* штамм 532/14 и *Acinetobacter baumannii* штамм 346/14 с наиболее высоким уровнем устойчивости к карбапенемам.

Для получения инокулюма готовили исходную суспензию суточной культуры микроба по стандарту 0,5 McFarland, далее суспензию разводили в 31 раз в бульоне Мюллера–Хинтон, при этом полученная взвесь содержала 5×10^6 КОЕ/мл. Далее во все ячейки, кроме ячейки З8 (контроль среды), вносили по 10 мкл микробной взвеси. Таким образом, в каждой ячейке конечная микробная нагрузка соответствующего тест-штамма составляла 5×10^4 КОЕ в 200 мкл. Разведение в ячейке, содержимое которой было прозрачным, принимали за МПК препаратов после высева на плотную питательную среду и получения роста тест-штамма.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты при генотипировании карбапенемаз тест-культур и значения МПК исследуемых карбапенемов представлены в табл. 1.

Как видно из данных табл. 1, все выделенные изоляты обладали высоким уровнем резистентности к карбапенемам. Так, для *A. baumannii* МПК меропенема составляла от 16 до 128 мкг/мл, МПК имипенема — от 8 до 256 мкг/мл. Основными генотипами карбапенемаз у *A. baumannii* являлись OXA-40 и OXA-23. По данным литературы [10],

Рис. 1. Оценка наличия МβЛ у *P. aeruginosa* штамм 532/14 с помощью Е-теста (имипенем — имипенем + ЭДТА)

Рис. 2. Оценка наличия МβЛ у *A. baumannii* штамм 346/14 с помощью Е-теста (имипенем — имипенем + ЭДТА)

группа ферментов OXA-40 и OXA-23 имеют плазмидную или хромосомную локализацию и характерны преимущественно для *Acinetobacter* spp. МПК меропенема и имипенема для изолятов *P. aeruginosa* составляла от 16 до 512 мкг/мл. Ферменты группы VIM являются одними из наиболее значимых среди МβЛ, описанных у *P. aeruginosa* [11]. Они гидролизуют все бета-лактамы, кроме монобактамов. МПК в отношении изолятов *K. pneumoniae* составила от 16 до 128 мкг/мл для меропенема и от 8 до 128 мкг/мл для имипенема. Ферменты группы NDM также являются значимыми среди металлобета-лактамаз.

Генотипированием у штамма *P. aeruginosa* 532/14 выявлена МβЛ генотипа VIM, а у *A. baumannii* 346/14 показано наличие карбапенемаз типа OXA. Однако с помощью Е-теста с ЭДТА показано наличие МβЛ у обоих штаммов, при этом наблюдалось снижение МПК имипенема до 1 мкг/мл (рис. 1, 2).

Влияние перспективного препарата бисфосфоната — ингибитора МβЛ — изучали «методом шахматной доски», где в контрольных тестах использовали сочетание одного из карбапенемов с ЭДТА. При обосновании заключения об усилении действия антибиотика в присутствии хелатирующего агента оценивали *индекс фракционной ингибирующей концентрации* ($\sum$ FIC), который находили по формуле [5]:

$$\Sigma\, FIC = \frac{МПК_{ас}}{МПК_{а}} + \frac{МПК_{бс}}{МПК_{б}},$$ где

$МПК_{ас}$ — минимальная подавляющая концентрация антибиотика (в мкг/мл), взятого в сочетании с комплексоном;
$МПК_{а}$ — минимальная подавляющая концентрация антибиотика, взятого как монопрепарат (в мкг/мл);
$МПК_{бс}$ — минимальная подавляющая концентрация комплексона (в мкг/мл), взятого в сочетании с антибиотиком;
$МПК_{б}$ — минимальная подавляющая концентрация комплексона, взятого как монопрепарат (в мкг/мл).

Авторами метода предложена следующая трактовка индекса: синергизм — индекс до 0,5; индифферентность — индекс от 0,51 до 4; антагонизм — индекс более 4.

В опыт с ЭДТА был взят антибиотик имипенем в разведениях от 1/16 до 1/1024 МПК (табл. 2). Использовали комплексон в дозах как превышающих МПК в 2–16 раз, так и ниже МПК в 2 и 4 раза. При этом в дозах, меньших МПК, наблюдали синергидное действие, при котором чувствительность антибиотика повышалась в 1024 раз. Следует отметить, что наши данные по МПК ЭДТА (1562 мкг/мл) совпадают с данными литературы [11].

Таким образом, по схеме «шахматной доски» (см. табл. 2) минимальная концентрация имипенема в первом эффективном сочетании с ЭДТА составила 0,5 мкг/мл, а комплексона — соответственно 390 мкг/мл (ячейка Б2).

$$\Sigma\, FIC = \frac{0{,}5}{512} + \frac{390}{1562} = 0{,}25$$

По формуле получаем, что индекс FIC составил 0,25, то есть в отношении *P. aeruginosa* штамм 532/14 наблюдали синергидный эффект таких концентраций комплексона и имипенема, что позволило повысить чувствительность микроорганизма к антибиотику в 1024 раза.

В табл. 3 представлен аналогичный эффект сочетания меропенема с ЭДТА в отношении *P. aeruginosa* штамм 532/14. Индекс FIC составил 0,25 (синергидный эффект).

Таблица 2. **Чувствительность *P. aeruginosa* штамм 532/14 (МПК имипенема 512 мкг/мл) к сочетанному действию имипенема и ЭДТА**

№ ячейки	ЭДТА, мкг/мл	Имипенем, мкг/мл							
		$К_1$	0,5	1	2	4	8	16	32
1		Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
2	390	Р	–	–	–	–	–	–	–
3	781	Р	–	–	–	–	–	–	–
4	1562	–	–	–	–	–	–	–	–
5	3125	–	–	–	–	–	–	–	–
6	6250	–	–	–	–	–	–	–	–
7	12500	–	–	–	–	–	–	–	–
8	25000	–	–	–	–	–	–	–	$К_2$
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З

Примечание. Здесь и в табл. 3–8: Р — рост есть; «–» — роста нет; $К_1$ — контроль культуры, рост есть; $К_2$ — контроль питательной среды, роста нет.

Таблица 3. **Чувствительность *P. aeruginosa* штамм 532/14 (МПК меропенема 512 мкг/мл) к сочетанному действию меропенема и ЭДТА**

№ ячейки	ЭДТА, мкг/мл	Меропенем, мкг/мл							
		$К_1$	0,5	1	2	4	8	16	32
1		Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
2	390	Р	–	–	–	–	–	–	–
3	781	Р	–	–	–	–	–	–	–
4	1562	–	–	–	–	–	–	–	–
5	3125	–	–	–	–	–	–	–	–
6	6250	–	–	–	–	–	–	–	–
7	12500	–	–	–	–	–	–	–	–
8	25000	–	–	–	–	–	–	–	$К_2$
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З

Таблица 4. **Чувствительность *P. aeruginosa* штамм 532/14 (МПК имипенема 512 мкг/мл) к сочетанному действию имипенема и Бонефоса**

№ ячейки	Бонефос, мкг/мл	Имипенем, мкг/мл							
		$К_1$	0,5	1	2	4	8	16	32
1		Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
2	469	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
3	938	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
4	1875	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	–
5	3750	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	–
6	7500	Р	Р	Р	–	–	–	–	–
7	15000	Р	Р	Р	–	–	–	–	–
8	30000	–	–	–	–	–	–	–	$К_2$
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З

В дальнейшем во всех опытах с бисфосфонатом получены и описаны данные по двум ячейкам — с МПК Бонефоса и его минимальной эффективной концентрацией, усиливающей действие антибиотика. Это сделано с целью показать синергидный эффект препарата, концентрация которого после-

Таблица 5. **Чувствительность *P. aeruginosa* штамм 532/14 (МПК меропенема 512 мкг/мл) к сочетанному действию меропенема и Бонефоса**

№ ячейки	Бонефос, мкг/мл	Меропенем, мкг/мл							
		$К_1$	0,5	1	2	4	8	16	32
1		Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
2	469	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	–
3	938	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	–
4	1875	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	–
5	3750	Р	Р	Р	Р	Р	Р	–	–
6	7500	Р	–	–	–	–	–	–	–
7	15000	Р	–	–	–	–	–	–	–
8	30000	–	–	–	–	–	–	–	$К_2$
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З

Таблица 6. **Чувствительность *A. baumannii* штамм 346/14 (МПК имипенема 256 мкг/мл) к сочетанному действию имипенема и Бонефоса**

№ ячейки	Бонефос, мкг/мл	Имипенем, мкг/мл							
		$К_1$	0,5	1	2	4	8	16	32
1		Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
2	469	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
3	938	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
4	1875	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
5	3750	Р	Р	–	–	–	–	–	–
6	7500	Р	Р	–	–	–	–	–	–
7	15000	Р	–	–	–	–	–	–	–
8	30000	–	–	–	–	–	–	–	$К_2$
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З

Таблица 7. **Чувствительность *A. baumannii* штамм 346/14 (МПК меропенема 128 мкг/мл) к сочетанному действию меропенема и Бонефоса**

№ ячейки	Бонефос, мкг/мл	Меропенем, мкг/мл							
		$К_1$	0,5	1	2	4	8	16	32
1		Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
2	469	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	–
3	938	Р	Р	Р	Р	Р	Р	–	–
4	1875	Р	Р	Р	Р	Р	–	–	–
5	3750	Р	–	–	–	–	–	–	–
6	7500	Р	–	–	–	–	–	–	–
7	15000	Р	–	–	–	–	–	–	–
8	30000	–	–	–	–	–	–	–	$К_2$
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З

однократного внутривенного или перорального введения постепенно снижается в организме пациента как в крови, так и в пораженных тканях. При этом в наших исследованиях полученные данные по МПК Бонефоса 30 000 мкг/мл совпадают с данными литературы, где описана МПК аналогичного препарата Синдронат на основе натриевой соли клодроновой кислоты [13] .

При использовании сочетаний Бонефоса с имипенемом выявлены следующие закономерности (табл. 4). В опыт были взяты следующие концентрации Бонефоса: МПК в отношении тест-штамма (30 000 мкг/мл), а также 1/2÷1/64 МПК. Выявлено максимальное увеличение чувствительности *P. aeruginosa* штамм 532/14 к имипенему в 256 раз при сочетании с дозой Бонефоса, равной 1/4 МПК (ячейка Г6). Индекс FIC в данном опыте составил 0,25 (синергидный эффект). Необходимо отметить увеличение чувствительности тест-культуры к имипенему в 16 раз при сочетании с дозой Бонефоса, равной 1/16 МПК (ячейка З4). Индекс FIC при этом составил 0,12 (синергидный эффект).

При сочетании Бонефоса с меропенемом (табл. 5) максимальное усиление действия антибиотика в 1024 раза получено при дозе комплексона 1/4 МПК (ячейка Б6). Индекс FIC составил 0,25 (синергидный эффект). Следует отметить, что при повышении чувствительности тест-штамма к меропенему в 16 раз доза Бонефоса составила 1/64 МПК (ячейка З2). Индекс FIC при этом был равен 0,08. Таким образом, в данных опытах был также выявлен эффект синергизма меропенема и Бонефоса.

В другой группе опытов изучали сочетанное действие бисфосфоната и карбапенемов в отношении тест-штамма *A. baumannii* 346/14. Бонефос использовали в концентрациях, равных МПК, а также 1/2÷1/64 МПК. Наблюдали усиление действия имипенема (табл. 6) в 512 раз при сочетании с Бонефосом в дозе 1/2 МПК (ячейка Б7). Индекс FIC составил 0,5 (синергидный эффект). При сочетанном использовании препарата в дозе 1/8 МПК получено усиление действия имипенема в 256 раз (ячейка В5). При этом индекс FIC равен 0,13 (синергидный эффект) .

При сочетании Бонефоса в дозе 1/8 МПК с меропенемом (табл. 7) получено усиление действия антибиотика в 256 раз (ячейка Б5). Индекс FIC равен 0,13 (синергидный эффект). Увеличение чувствительности тест-штамма *A. baumannii* 346/14 в 4 раза наблюдали в сочетании с Бонефосом в дозе 1/64 МПК (ячейка З2). Индекс FIC в этом случае составил 0,27 (синергидный эффект) .

Таким образом, выявлено синергидное действие бисфосфоната Бонефос и карбапенемов в отношении штаммов *P. aeruginosa* 532/14 и *A. baumannii* 346/14, продуцирующих МβЛ.

Следует отметить, что при генотипировании *A. baumannii* штамм 346/14 МβЛ не были выявлены, но их наличие подтверждено фенотипически с помощью Е-теста с ЭДТА. Можно предположить, что данный тест-штамм обладает редким видом МβЛ, которая не была выявлена с помощью ПЦР.

Известно, что ЭДТА не ингибирует другие группы бета-лактамаз, в том числе бета-лактамазы расширенного спектра и AmpC-бета-лактамазы. Таким образом, чувствительность к ингибитору является одним из важнейших маркеров образования МβЛ [3] .

K. Bush и G. Jacoby [14] классифицировали бета-лактамазы, учитывая их принадлежность к тому или иному молекулярному классу по R. Ambler [2], но при этом брали за основу спектр их действия на антибиотики бета-лактамной структуры и чувствительность к ингибиторам бета-лактамаз [15] .

Проведенные нами ранее исследования [16] показали, что хелатообразующие агенты, в частности ЭДТА, продуцирующие стабильные комплексы с катионами металлов, способны изменять проницаемость бактериальных мембран. Это обусловлено быстрым выделением из клеточной оболочки в окружающую среду липополисахарида и некоторых белков, которые удерживаются в наружной мембране грамотрицательных бактерий за счет связывания их ионами металлов через фосфатные группы. В результате обработки микробных клеток ЭДТА возрастает их проницаемость для многих антибиотиков (актиномицина, полимиксина В, тетрациклина, хлорамфеникола и пенициллинов), а также антисептиков (хлоргексидина, диметилбензилалкиламмоний хлорида) .

Результаты последних исследований показали высокий уровень резистентности к карбапенемам клинических штаммов *P. aeruginosa* 532/14 и *A. baumannii* 346/14 и его снижение в присутствии препарата Бонефос в 4÷1024 раза (синергидный эффект), поэтому можно предположить, что Бонефос способен ингибировать металло-бета-лактамазы. Эти данные свидетельствуют о возможном действии бисфосфонатов на разные механизмы резистентности у микроорганизмов, а именно: ингибирование МβЛ и повышение проницаемости клеточных мембран.

Заключение

Все выделенные изоляты *P. aeruginosa* обладали металло-бета-лактамазой VIM. Тест-культуры *A. baumannii* содержали карбапенем-гидролизующие бета-лактамазы класса D (OXA-23, OXA-40) .

Достижение синергидного действия двух антибиотиков с целью повышения эффективности химиотерапии привлекает самое большое внимание исследователей. При этом можно выделить два положения: 1) синергидное действие достижимо при использовании определенного круга антимикробных препаратов; 2) синергидный эффект проявляется относительно не часто, методы его про-

гнозирования пока недостаточно надежны [17]. На сегодняшний день изучен принцип эффективного сочетанного действия антибиотиков на микроб — подавление одним из препаратов механизма защиты микроорганизма. Ингибиторы бета-лактамаз (клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам) оказывают слабое действие на микроорганизмы, но отличаются высоким сродством к бета-лактамазам. Именно эти препараты обеспечивают инактивацию ферментов до того, как последние успевают расщепить –C–N-связь в структуре другого антибиотика.

К сожалению, современные ингибиторы бета-лактамаз не универсальны по действию на бактериальные ферменты, число которых растет. Кроме того, подобрать сочетание ингибитора с активным антибактериальным веществом непросто, для этого оба препарата должны иметь совпадающие (хотя бы частично) фармакокинетические свойства, иначе они будут действовать не синергидно. Среди других механизмов синергидного действия можно допустить возможность того, что угнетение двумя антибиотиками разных мишеней в бактериальной клетке будет способствовать потенцированному эффекту.

Бисфосфонаты обладают высоким сродством к минеральным компонентам костной ткани. Основным механизмом действия клодроновой кислоты (Бонефос) является подавление активности остеокластов и уменьшение опосредованной ими резорбции костной ткани. При применении этого препарата в максимальных дозах влияние на нормальную минерализацию кости у человека не наблюдается [18]. Бисфосфонаты — лекарственные средства, применяемые, в основном, для профилактики и лечения остеолитических метастазов злокачественных опухолей и миеломной болезни (множественной миеломы), а также гиперкальциемии, обусловленной злокачественными опухолями. Они разрешены для системного применения (перорального и внутривенного). При этом отмечено, что явная связь между концентрацией клодроновой кислоты в плазме крови и терапевтическим эффектом или побочными реакциями отсутствует [18]. Курс лечения Бонефосом составляет 7 дней (максимальная суточная доза при пероральном приёме — 3200 мг, при внутривенном введении — 1500 мг). Всасывание клодроновой кислоты в ЖКТ происходит быстро и составляет приблизительно 2% от суточной пероральной дозы в 1600 мг [18]. При этом внутривенное введение препарата гарантирует 100% биодоступность, так как клодронат практически моментально всасывается из крови в костную и мышечную ткани [19]. Степень абсорбции препарата и его выведения могут значительно варьировать у различных пациентов. Отмечено, что около 70–80% абсорбированного препарата выводится почками в течение 1–2 дней после приема суточной дозы, т.е. 20–30% клодроната остаются абсорбированными в костной ткани и выводятся из организма в течение длительного времени [18, 20]. Имеются данные о фармакокинетике клодроната, введенного внутривенно в дозе 200 мг/сутки, где отмечено, что 50% препарата выводится почками и 50% абсорбируется в костную ткань. Таким образом, показано, что 100 000 мкг препарата остаются в тканях [19]. В то же время необходимо отметить, что в соответствии с Инструкцией по медицинскому применению препарата, на которую должны ориентироваться клинические фармакологи и практикующие врачи, максимальная суточная доза Бонефоса при внутривенном введении составляет 1500 мг, при пероральном применении — 1600 мг (максимальная доза — 3200 мг в сутки) [18].

Сочетанное применение бисфосфоната (препарата «Бонефос») с карбапенемами приводило к усилению действия соответствующего антибиотика по принципу синергидного эффекта, при этом были получены следующие закономерности. Во всех опытах наблюдали синергидное действие совместного применения Бонефоса с импенемом или меропенемом в отношении обоих тест-штаммов грамотрицательных микроорганизмов. В сочетании с Бонефосом в отношении *P. aeruginosa* штамм 532/14 отмечено усиление действия имипенема в 16–256 раз, меропенема — в 16–1024 раза; в отношении *A. baumannii* штамм 346/14 наблюдали увеличение активности имипенема в 256–512 раз, меропенема — в 4–256 раз. Следует отметить, что такой эффект получен при использовании Бонефоса в концентрациях, равных от 1/2 МПК (15 000 мкг/мл) до 1/64 МПК (469 мкг/мл) .

Основываясь на данных литературы о фармакокинетике клодроната, нами была проведена оценка возможной терапевтической эффективности полученных концентраций Бонефоса, при которых наблюдали синергидное действие с карбапенемами. Так, концентрация препарата 3750 мкг/мл соответствует эффективному пероральному приему 937,5 мг клодроната при условии всасывания 2% из них и остаточной абсорбции в костной ткани 20%, тогда как рекомендованная суточная доза составляет 1600 мг. Таким образом, полученное нами эффективное (до уровня чувствительности) снижение МПК карбапенемов в присутствии Бонефоса наблюдали в концентрациях препарата 3750–7500 мкг/мл, что значительно ниже содержания клодроната в тканях скелета человека после

перорального приема или внутривенного введения рекомендованных суточных доз.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования бисфосфонатов как ингибиторов МβЛ, особенно при инфекционно-воспалительных заболеваниях костной ткани.

Литература

1. Шевченко О. В., Эйдельштейн М. В., Степанова М. Н. Металло-β-лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий. Клин микробиол антимикроб химиотер 2007; 9(3):211-19.
2. Ambler R., Coulson A., Frere J., et al. A standart numbering scheme for the Class A beta-lactamases. Biochem J 1991; 276 (1):269-72.
3. Поляк М. С. Лабораторное обеспечение антибиотикотерапии 2012; 256.
4. Афиногенова А. Г., Мадай Д. Ю., Афиногенов Г. Е., Лебедева И. К., Петрова Т. М. Влияние бисгуанидинов и бисфосфонатов на факторы антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий. Инфекции в хирургии 2013; 11 (3):15-8.
5. Eliopoulos G. M., Moellering R. C. 1991. Antimicrobial combinations, p. 432-492. In: V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medicine. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
6. Moody J. Sinergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. In H. Isenberg (Ed.) Clinical Microbiology Procedures Handbook 2004; 2:5.12.1-21.
7. Приказ МЗ СССР от 22.04.1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».
8. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга I. Под редакцией Лабинской А. С., Волиной Е. Г. 2008; 1080.
9. Методические указания «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». МУК 4.2.1890-04.
10. Сидоренко С. В., Партина И. В., Агеевец В. А. Имипенем: 30 лет терапии. Антибиотики и химиотерапия 2013; 58 (5-6):55-61.
11. Watanabe M., Iyobe S., Inoue M., Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:147-51.
12. Lambert R. G.W. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. JAMA 2004; 96:244-53.
13. Kruszewska H. Search of antimicrobial activity of selected non-antibiotic drugs. Acta Pol Pharm 2002; 59(6):436-9.
14. Bush K., Jacoby G. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(3):969-76.
15. Drawz S., Bonomo R. Three decades of beta-lactamase inhibitors. Clin Microbiol Rev 2010; 23 (1):160-201.
16. Афиногенов Г.Е, Панарин Е. Ф., Копейкин В. В. Влияние полимерных комплексонов на основе сополимеров винилпирролидона с винилиминодиуксусной кислотой и метакрилоилацетоном на чувствительность к антибиотикам антибиотикочувствительных штаммов бактерий. Антибиотики 1978; 5:419-24.
17. Поляк М. С. Антибиотикотерапия. Теория и практика 2010; 424.
18. Государственный реестр лекарственных средств РФ (http://grls.rosminzdrav.ru).
19. Muratore M. Clinical utility of clodronate in the prevention and management of osteoporosis in patients intolerant of oral bisphosphonates. Drug Design, Development and Therapy 2011; 5:445-54.
20. Castren-Kortekangas P., Löyttyniemi E., Liukko-Sipi S., Juhakoski A, Smal J., Laitinen L. Pooling of clodranate urinary excretion data: A new pharmacokinetic method to study drugs with highly variable gastrointestinal absorption. J Bone Miner Res 1997; 12:66-71.