

*На правах рукописи*

*Смирнова Мария Владимировна*

**ФАРМАКОДИНАМИКА ДАПТОМИЦИНА И ВАНКОМИЦИНА В  
СИСТЕМАХ *IN VITRO*, МОДЕЛИРУЮЩИХ ФАРМАКОКИНЕТИКУ  
АНТИБИОТИКОВ: ПРОГНОЗИРОВАНИЕ АНТИСТАФИЛОКОККОВОГО  
ЭФФЕКТА И РАЗВИТИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ**

14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва  
2008

Работа выполнена в ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков  
им. Г.Ф. Гаузе Российской академии медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
профессор

Фирсов Александр Алексеевич

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор

Жердев Владимир Павлович

доктор биологических наук

Сингин Александр Стефанович

**Ведущая организация:**

Российский государственный медицинский университет

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2008 г. в \_\_\_\_\_ час на заседании диссертационного совета Д. 001.024.01 в ГУ НИИ фармакологии имени В.В.Закусова РАМН по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ фармакологии им. В.В.Закусова РАМН по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8.

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2008г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

Е.А. Вальдман

2008А  
6008

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

**Актуальность проблемы.** Широкое распространение антибиотикоустойчивых возбудителей инфекционных заболеваний диктует необходимость создания новых антибиотиков, способных воздействовать не только на чувствительные, но и на резистентные бактерии. Это обстоятельство потребовало внести серьезные коррективы в методологию фармакодинамических исследований, в частности предусмотреть возможность прогнозирования и предотвращения процессов селекции резистентных мутантов при различных режимах введения антибиотика. Для достижения указанных целей все чаще применяются динамические системы, которые позволяют изучать фармакодинамику антибиотиков *in vitro* и оценивать их эффективность при фармакокинетически обусловленных изменениях концентрации препаратов [Фирсов А.А. и соавт., 1989; Bergan T., 1986; Blaser J., 1985; Firsov A.A. et al., 2007; Zinner S.H., 1987]. Благодаря использованию таких систем оказалось возможным успешно прогнозировать эквивалентные уровни и дозы новых фторхинолонов [Firsov A.A. et al., 1998 и 2000; Vostrov S.N. et al., 2000], а также установить зависимость селекции резистентных стафилококков [Фирсов А.А. и соавт., 2003; Firsov A.A. et al., 2003], пневмококков [Zinner et al., 2003] и псевдомонад [Tam V.H., et al., 2005] от отношения площади под фармакокинетической кривой в пределах 24 ч (ПФК<sub>24</sub>) фторхинолона к его минимальной подавляющей концентрации для данного штамма бактерии (МПК) - ПФК<sub>24</sub>/МПК. Кривые зависимости резистентности к фторхинолонам от ПФК<sub>24</sub>/МПК имели куполообразную форму, что согласуется с недавно выдвинутой гипотезой об «окне селекции мутантов» (ОСМ - «*mutant selection window*») [Zhao X., Drlica K., 2001]. Согласно этой гипотезе селекция устойчивых мутантов наиболее вероятна, когда концентрации антибиотика попадают в ОСМ, ограниченный снизу уровнем МПК, а сверху – минимальной концентрацией, предотвращающей рост устойчивых мутантов (МПК<sub>М</sub> – МРС).

В связи с этим проверка гипотезы ОСМ для антибиотиков других групп, в частности новых липо- и гликопептидов, а также оценка их фармакодинамических свойств в динамических системах *in vitro* весьма актуальны.

**Цель работы.** Прогнозирование антистафилококкового эффекта нового липопептидного антибиотика даптомицина при моделировании его терапевтических концентраций, а также прогнозирование способности даптомицина предотвращать селекцию резистентных мутантов при моно- и комбинированной терапии.

РОС. НАЦИОНАЛЬНАЯ  
БИБЛИОТЕКА  
С.-Петербург  
03 2008 акт 241

Для достижения этой цели предстояло решить следующие задачи:

1. Выбрать оптимальный метод количественной оценки антимикробного эффекта на примере анализа кинетики гибели и вторичного роста стафилококков под действием липо- и гликопептида (даптомицин и ванкомицин) в динамической системе *in vitro*.

2. Установить зависимость антистафилококкового эффекта даптомицина и ванкомицина от моделируемого значения ПФК<sub>24</sub>/МПК на основе сравнительного изучения их фармакодинамики.

3. Оптимизировать условия выявления резистентных стафилококков *in vitro* и установить зависимость их селекции от ПФК<sub>24</sub>/МПК даптомицина (при его введении отдельно и в сочетании с рифампицином) и ванкомицина.

**Научная новизна работы.** В результате проведенных исследований:

1. Теоретически обоснован интегральный метод количественной оценки антимикробного эффекта даптомицина и ванкомицина в динамической системе, моделирующей их фармакокинетику у человека, по площади между кривыми гибели/вторичного роста бактерий в присутствии антибиотика и их роста в его отсутствие (интенсивность эффекта - параметр  $I_E$ ).

2. Впервые установлена инвариантная относительно бактериального штамма и антибиотика зависимость антистафилококкового эффекта даптомицина и ванкомицина, выраженного параметром  $I_E$ , от отношения ПФК<sub>24</sub>/МПК.

3. Разработаны новые методические подходы к выявлению *in vitro* даптомицино- и ванкомицинорезистентных мутантов *Staphylococcus aureus* и установлена зависимость их селекции от моделируемого значения ПФК<sub>24</sub>/МПК.

4. На основе зависимости от ПФК<sub>24</sub>/МПК численности колоний *S. aureus*, резистентных к антибиотику, или изменений в МПК после многократного введения даптомицина и ванкомицина установлено, что наибольшие потери в чувствительности к ним стафилококков, а также максимальная селекция резистентных мутантов происходят при значениях ПФК<sub>24</sub>/МПК, равных 32-64 ч, которые ниже терапевтических.

5. Доказана принципиальная возможность подавления селекции даптомицино-резистентных мутантов *S. aureus* при сочетании применении даптомицина с рифампицином.

### **Научно-практическая значимость работы.**

1. Интегральный метод количественной оценки антимикробного эффекта, апробированный для даптомицина и ванкомицина, может быть использован при фармакодинамическом изучении других липо- и гликопептидов.

2. Благодаря инвариантности зависимости между  $I_E$  и ПФК<sub>24</sub>/МПК относительно бактериального штамма, она может быть использована для прогнозирования действия липо- и гликопептидов на репрезентативные штаммы *S. aureus*, в частности на те, для которых МПК равна МПК<sub>50</sub> или МПК<sub>90</sub>. По результатам такого прогноза, эффективность даптомицина в терапевтических дозах примерно равна эффективности ванкомицина.

3. Разработанные методические подходы к выявлению и прогнозированию селекции мутантов *S. aureus*, резистентных к даптомицину и ванкомицину, по величине ПФК<sub>24</sub>/МПК могут быть использованы и для других антибиотиков.

4. Продемонстрированное подавление селекции даптомицинорезистентных мутантов при сочетанном применении даптомицина с рифампицином является предпосылкой для испытаний указанной комбинации в клинике.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на 7-й Международной конференции МАКМАХ/ESCMID «Антимикробная терапия» (Москва, 2005), 7-м Европейском конгрессе по химиотерапии и инфекциям (7<sup>th</sup> ECCI, Флоренция, 2005), 15-м Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным болезням (15<sup>th</sup> ESCMID, Копенгаген, 2005).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 6 работ, из них 3 статьи в центральных журналах и 3 тезисов.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследования, выводы и список литературы, включающий 16 отечественных и 215 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 5 таблицами и 53 рисунками. Диссертация изложена на 170 страницах машинописного текста.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Антибиотики и бактериальные штаммы.** Даптомицин был предоставлен компанией Cubist Pharmaceuticals, Inc. (Лексингтон, США), а ванкомицин и рифам-

пицин были приобретены у компании MP Biomedicals, Inc. (Солон, США).

В работе использовали штаммы *Staphylococcus aureus*, поддержание бактериальных культур обеспечивали путем их периодического посева на плотную питательную среду - агар Мюллера-Хинтон II (МХА II). Для изучения фармакодинамики даптомицина и ванкомицина были выбраны клинические штаммы – метициллиноустойчивый *S. aureus* 866 и метициллиночувствительный *S. aureus* 10. В экспериментах с даптомицином и рифампицином использовали метициллиноустойчивые штаммы *S. aureus* ATCC 43300 и *S. aureus* 866. Значения МПК антибиотиков устанавливали методом серийных разведений в бульоне Мюллера-Хинтон (МХБ, в случае с даптомицином обогащен  $Ca^{++}$ ), содержащем 24-часовую культуру стафилококка с исходной численностью клеток, равной  $5 \times 10^5$  колониеобразующих единиц (КОЕ) в мл (КОЕ/мл). Для более точной оценки МПК антибиотиков использовали серийные разведения с различными значениями исходной концентрации. Значения МПК антибиотиков для изученных штаммов приведены в таблице 1.

Табл. 1. Значения МПК (в мкг/мл)/МПК<sub>М</sub> (в мкг/мл) антибиотиков.

антибиотик	<i>S. aureus</i> 866	<i>S. aureus</i> 10	<i>S. aureus</i> ATCC 43300
даптомицин	0,35/1,1	1,1/5,5	0,39/12,5
ванкомицин	0,70/2,4	1,3/11	—*
рифампицин	0,012/>800	—*	0,012/>800

\*Значения МПК и МПК<sub>М</sub> антибиотика для данного штамма не определяли.

Оценку МПК<sub>М</sub> осуществляли методом X. Zhao и K. Drlica (2001) (рис. 1). После инкубирования при 37°C в течение суток, суспензию клеток стафилококка в МХБ концентрировали для достижения численности клеток, равной  $10^{10}$ - $10^{11}$  КОЕ/мл, путем центрифугирования (4000×g в течение 10 мин). Полученную суспензию высевали на чашки Петри, содержащие антибиотик. Точное значение МПК<sub>М</sub> для каждой пары антибиотик – микроорганизм рассчитывали по результатам регрессионного анализа зависимости числа колониеобразующих единиц стафилококка от концентрации антибиотика, содержавшегося в МХА II – см. рис. 1. Значения МПК<sub>М</sub> антибиотиков для изученных штаммов приведены в таблице 1.

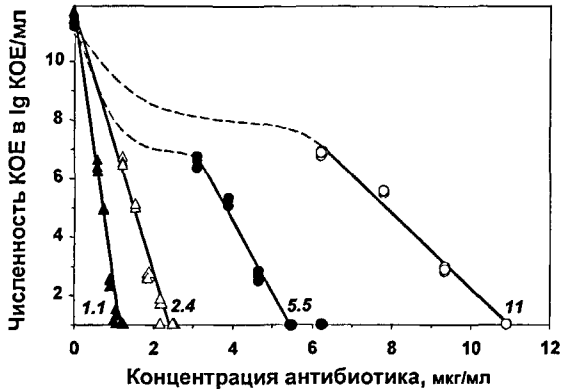


Рис. 1. Оценка МПК<sub>М</sub> даптомицина (темные символы) и ванкомицина (светлые символы) в отношении *S. aureus* 866 (треугольники) и *S. aureus* 10 (кружки). Цифрами на графике обозначены значения МПК<sub>М</sub> антибиотиков.

**Моделируемые фармакокинетические профили.** Во всех случаях моделировали моноэкспоненциальные фармакокинетические профили антибиотиков со значениями периода полувыведения ( $T_{1/2}$ ), соответствующими установленным при клиническом изучении фармакокинетики даптомицина (9 ч), ванкомицина (6 ч) и рифампицина (3 ч).

В экспериментах с однократным введением даптомицина и двукратным введением ванкомицина с интервалом в 12 ч моделируемые значения отношения ПФК в пределах от 0 ч до бесконечности (ПФК<sub>0-∞</sub>) к МПК (ПФК<sub>0-∞</sub>/МПК) составляли соответственно 67-540 и 33-540 ч (*S. aureus* 866) и 43-970 и 73-1150 ч (*S. aureus* 10). При 5-дневном введении даптомицина и ванкомицина значения ПФК<sub>24</sub>/МПК составляли 16-256 (*S. aureus* 866) и соответственно 16-256 и 14-432 ч (*S. aureus* 10). При моделировании сочетанного применения даптомицина с рифампицином (опыты с 5-дневным введением антибиотиков) значение ПФК<sub>24</sub>/МПК даптомицина составляло 64 ч, а рифампицина - 100 и 500 ч. Большинство экспериментов были проведены в двух и более повторностях.

**Динамическая система *in vitro*.** Для моделирования фармакокинетических профилей и изучения фармакодинамики антибиотиков использовали динамическую систему, описанную ранее [Фирсов А.А. и соавт., 1989]. Такая система состоит из соединенных между собой сосудов – вспомогательного, содержащего свежий МХБ («растворитель»), и основного (№1), содержащего МХБ с бактериальной культурой без (контроль) или с антибиотиком (опыт) (рис. 2 (а)).

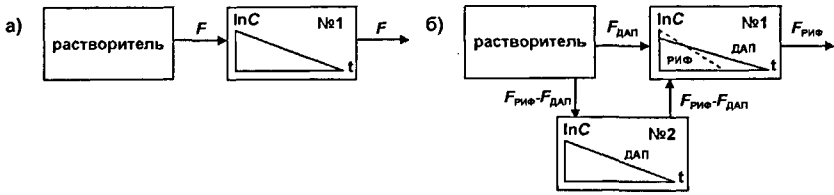


Рис. 2. Принцип воспроизведения моноэкспоненциального снижения концентрации антибиотика (а) и одновременного воспроизведения моноэкспоненциальных профилей двух антибиотиков (б) в динамической системе.

С помощью перистальтического насоса МХБ из вспомогательного сосуда подается в основной сосуд, из которого с той же объемной скоростью ( $F$ ) удаляется МХБ с бактериальной культурой (контроль) или с культурой и антибиотиком (опыт). При этом объем МХБ в сосуде №1 ( $V_1$ ) остается постоянным. Таким образом, соотношение объемной скорости и объема жидкости в основном сосуде моделируют соотношение общего клиренса и кажущегося объема распределения антибиотика у человека.

Расчет величины  $F$ , необходимой для обеспечения заданной скорости элиминации антибиотика при выбранном значении  $V_1$ , осуществляется по формуле [1]

$$F = V_1 \times \ln 2 / T_{1/2}. \quad [1]$$

Согласно формуле [1] для 60-мл объема среды в сосуде №1 расчетные значения  $F$  составляли 4,6 мл/ч для даптомицина ( $F_{\text{дап}}$ ) и 6,9 мл/ч для ванкомицина ( $F_{\text{ван}}$ ).

Для одновременного моделирования моноэкспоненциальных профилей двух антибиотиков (даптомицин и рифампицин), характеризующихся разными значениями  $T_{1/2}$ , был использован принцип суперпозиции потоков, поскольку каждому из антибиотиков соответствует свое собственное значение  $F$  ( $F_{\text{дап}}$  и  $F_{\text{риф}}$ ). При этом использовалась более сложная динамическая система [Blaser J., 1985], состоящая из 3 сосудов (рис. 2 (б)).

В этом случае вспомогательный сосуд параллельно соединен с двумя сосудами - основным (№1) и дополнительным (№2), который в свою очередь соединен с сосудом №1. В начальный момент времени в сосуд №1, содержащий МХБ с бактериальной культурой, добавляются оба антибиотика, а в сосуд №2 - только один антибиотик, характеризующийся более высоким значением  $T_{1/2}$  (даптомицин), в количестве, необходимом для достижения заданных значений их начальной концентрации. Для воспроизведения неодинаковой скорости элиминации



даптомицина и рифампицина МХБ из вспомогательного сосуда подается в сосуд №1 с объемной скоростью  $F_{\text{ДАП}}$ , а в сосуд №2 – с объемной скоростью  $F_{\text{РИФ}} - F_{\text{ДАП}}$ . С той же объемной скоростью  $F_{\text{РИФ}} - F_{\text{ДАП}}$  МХБ с даптомицином подается из сосуда №2 в сосуд №1. При этом результирующая объемная скорость подачи МХБ из вспомогательного сосуда и МХБ с даптомицином из сосуда №2 в сосуд №1 складывается из  $F_{\text{ДАП}}$  и  $(F_{\text{РИФ}} - F_{\text{ДАП}})$ , т.е. равна  $F_{\text{РИФ}}$ . Таким образом, удастся предотвратить слишком быстрое выведение даптомицина из основного сосуда, определяемое величиной  $F_{\text{РИФ}}$ , и сохранить постоянство его объема. Поскольку с той же объемной скоростью удаляется содержимое сосуда №1, его объем сохраняется постоянным. При этом значения  $F_{\text{ДАП}}$  и  $F_{\text{РИФ}}$  рассчитываются по формуле [1]. Для 85-мл объема среды в сосуде №1 ( $V_1$ ) значения  $F_{\text{ДАП}}$  и  $F_{\text{РИФ}}$  составляли 6,5 и 19,6 мл/ч, соответственно, а объем сосуда №2 ( $V_2$ ), рассчитанный по формуле  $V_2 = [(F_{\text{РИФ}} - F_{\text{ДАП}})/F_{\text{ДАП}}] \times V_1$ , составлял 170 мл.

Перед началом каждого эксперимента систему стерилизовали, заполняли свежим МХБ и термостатировали при  $37^\circ\text{C}$ . В сосуд №1 вносили 18-часовую бактериальную культуру ( $10^6$  КОЕ/мл в опытах с однократным или двукратным введением антибиотика или  $10^8$  КОЕ/мл в опытах с многократным введением), а затем, после получасовой инкубации, вводили антибиотик. В течение эксперимента из сосуда №1 отбирали пробы, которые после разведения стерильной дистиллированной водой высевали на чашки Петри с МХА II без антибиотика (оценка численности бактериальной популяции) и с антибиотиком (оценка численности устойчивой субпопуляции). Нижний предел определения численности клеток бактерий составлял  $1 \times 10^2$  и  $1 \times 10^1$  КОЕ/мл, соответственно.

#### Оценка антимикробного эффекта в отношении чувствительной и устойчивой субпопуляций и его зависимость от ПФК<sub>0-∞</sub>/МПК или ПФК<sub>24</sub>/МПК.

Антимикробный эффект характеризовали временем снижения численности жизнеспособных бактерий в 10 ( $T_{90\%}$ ) и 100 раз ( $T_{99\%}$ ); минимальной численностью жизнеспособных клеток ( $N_{\text{мин}}$ ); числом клеток в момент времени  $\tau$ , кратный интервалу дозирования, например, через 48 ч от начала эксперимента ( $N_\tau$ ); площадью между кривыми изменения численности клеток в контроле и опыте в пределах  $\tau$ , например, от 0 до 48 ч ( $ABBC$ ) и от 0 ч до того момента, когда указанные кривые совмещаются ( $I_E$ ) (рис.3).

При однократном введении даптомицина и двукратном введении ванкомицина зависимость эффекта от ПФК<sub>0-∞</sub>/МПК описывали уравнением [2]

$$Y = a \times \lg(x) + b,$$

[2]

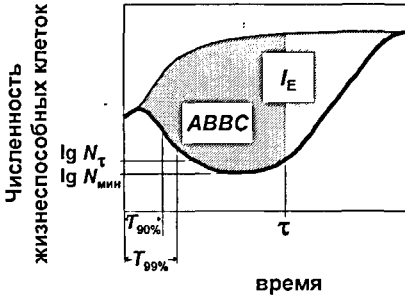


Рис. 3. Параметры антимикробного эффекта.

Селекцию резистентных мутантов *S. aureus* характеризовали разностью логарифмов максимального ( $N_{\max}$ ) и исходного ( $N_{\text{исх}}$ ) числа колоний на среде с антибиотиком, отношением величины МПК в конце эксперимента ( $\text{МПК}_{\text{кон}}$ ) к исходному значению МПК ( $\text{МПК}_{\text{исх}}$ ), а также площадью под кривой «логарифм числа мутантов – время» ( $ABBC_M$ ). Зависимость  $\lg(N_{\max}/N_{\text{исх}})$  или  $\text{МПК}_{\text{кон}}/\text{МПК}_{\text{исх}}$  от ПФК<sub>24</sub>/МПК описывали уравнением [4]

$$Y = Y_0 + a \exp[-0,5(x - x_c)^2/b^2], \quad [4]$$

где  $Y$  –  $\lg(N_{\max}/N_{\text{исх}})$  или  $\text{МПК}_{\text{кон}}/\text{МПК}_{\text{исх}}$ ,  $Y_0$  – минимальное значение  $Y$ ,  $x$  –  $\lg(\text{ПФК}_{24}/\text{МПК})$ ,  $x_c$  – значение  $\lg(\text{ПФК}_{24}/\text{МПК})$ , соответствующее максимальному значению  $\lg(N_{\max}/N_{\text{исх}})$  или  $\text{МПК}_{\text{кон}}/\text{МПК}_{\text{исх}}$ , а  $a$  и  $b$  – параметры.

#### Методические подходы к оценке антистафилококкового эффекта даптомицина и ванкомицина

В связи с тем, что вид зависимости антистафилококкового эффекта даптомицина и ванкомицина от концентрации неизвестен, на первом этапе фармакодинамических исследований была оптимизирована методология оценки этого эффекта, обеспечивающая установление количественных соотношений «ПФК/МПК – эффект». С этой целью изучена кинетика гибели/вторичного роста клеток *S. aureus* 866 и *S. aureus* 10 при моделировании в динамической системе однократного введения даптомицина и двукратного введения ванкомицина с интервалом в 12 ч.

Во всех случаях кинетические кривые изменения численности жизнеспособных клеток *S. aureus* характеризовались сокращением численности кле-

где  $x$  – ПФК<sub>0-∞</sub>/МПК,  $Y$  –  $T_{90\%}$ ,  $T_{99\%}$ ,  $N_{\min}$ ,  $N_{\tau}$ ,  $ABBC$  или  $I_E$ , а  $a$  и  $b$  – параметры, при многократном введении – уравнением [3]

$$E = E_{\min} + (E_{\max} - E_{\min})/[1 + (x/x_{50})^s], \quad [3]$$

где  $x$  – ПФК<sub>24</sub>/МПК,  $E$  –  $I_E$ ,  $E_{\max}$  и  $E_{\min}$  – максимальное и минимальное значения антимикробного эффекта,  $x_{50}$  – значение  $x$ , определяемое выражением  $(E_{\min} + E_{\max})/2$ , а  $s$  – параметр.

ток стафилококка под влиянием антибиотиков с последующим возобновлением их роста (рис. 4).

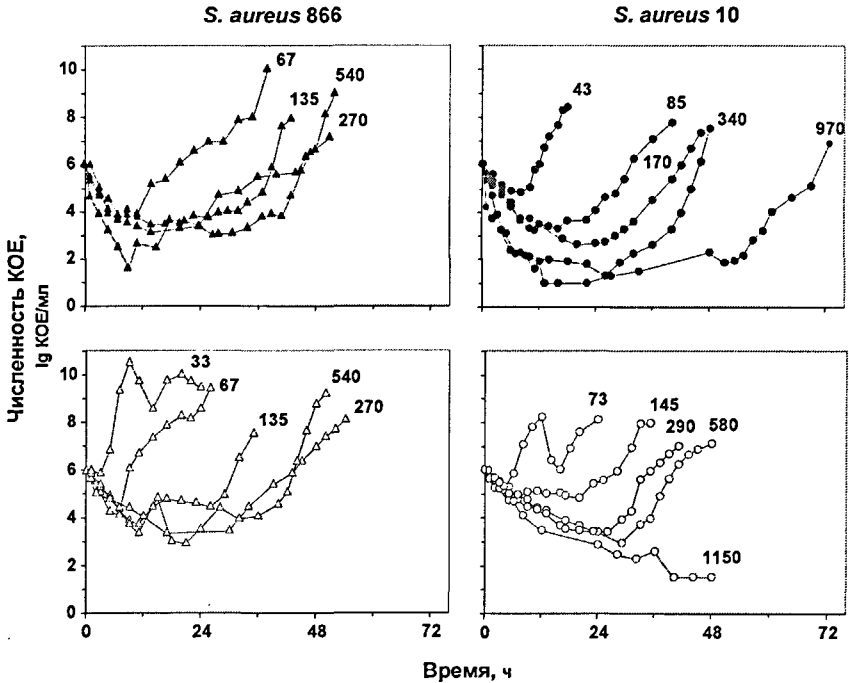


Рис. 4. Кинетические кривые изменения численности клеток *S. aureus* 866 и *S. aureus* 10 под действием даптомицина и ванкомицина. Цифрами у кривых обозначены моделируемые значения  $PFK_{0-\infty}/MPK$  (в часах). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

В целом, повышение моделируемого значения  $PFK_{0-\infty}/MPK$  приводило к снижению минимальной численности жизнеспособных клеток *S. aureus* 10 и вызывало задержку возобновления их роста. Менее определенной оказалась взаимосвязь между моделируемым значением  $PFK_{0-\infty}/MPK$  и параметрами кинетических кривых, отражающих процессы гибели/вторичного роста клеток *S. aureus* 866. Так, повышение величины  $PFK_{0-\infty}/MPK$  даптомицина и ванкомицина от 135 до 540 ч практически не оказывало влияния на динамику гибели/роста стафилококка в динамической системе.

Кроме того, визуальное сравнение кинетических кривых при одинаковых или сопоставимых значениях  $PFK_{0-\infty}/MPK$  не позволяло объективно сравнивать эффекты антибиотиков, что указывает на необходимость их параметризации.

Описанные кинетические кривые были охарактеризованы 6 параметрами (рис.5).

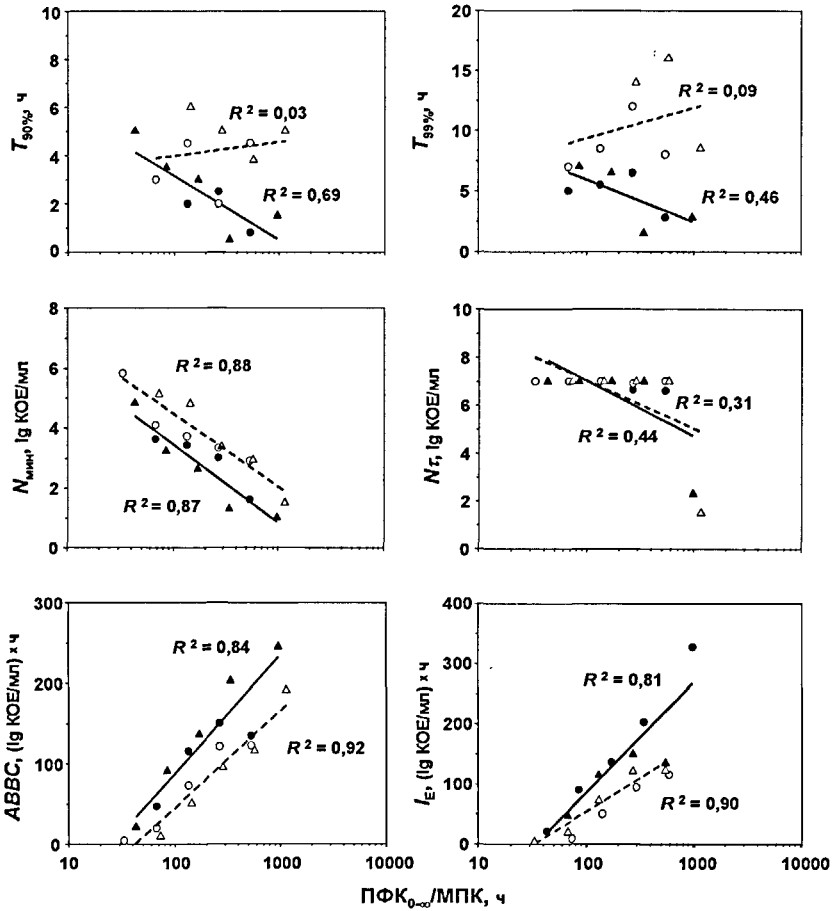


Рис. 5. Зависимость параметров антистафилококкового эффекта даптомицина (непрерывная линия) и ванкомицина (пунктирная линия) от  $\text{ПФК}_{0-\infty}/\text{МПК}$ , описанная уравнением [2], для *S. aureus* 866 и *S. aureus* 10. Обозначения те же, что на рис. 1.

Как видно на рисунке, параметры  $T_{90\%}$  и  $T_{99\%}$ , отражающие скорость гибели клеток под действием антибиотика в начальной фазе кинетической кривой, не коррелируют с логарифмом моделируемого отношения  $\text{ПФК}_{0-\infty}/\text{МПК}$  ванкомицина ( $R^2$  0,03-0,09) и слабо коррелируют с логарифмом  $\text{ПФК}_{0-\infty}/\text{МПК}$  даптомицина ( $R^2$  0,46-0,69). Более того, по крайней мере, для ванкомицина полученные зависимости  $T_{90\%}$  и  $T_{99\%}$  от  $\text{ПФК}_{0-\infty}/\text{МПК}$  парадоксальны: вопреки логике эффект, выраженный этими параметрами, слабее при высоких значениях  $\text{ПФК}_{0-\infty}/\text{МПК}$ , чем при низких.

В отличие от  $T_{90\%}$  и  $T_{99\%}$ , параметр  $N_{\text{мин}}$ , характеризующий центральную фазу

кривой, коррелирует с логарифмом ПФК<sub>0-∞</sub>/МПК ( $R^2$  0,87 и 0,88 для даптомицина и ванкомицина, соответственно), а параметр  $N_t$ , характеризующий конечную фазу кривой, - нет. Как видно на рисунке, величина  $N_t$  практически не изменяется при увеличении моделируемого значения ПФК<sub>0-∞</sub>/МПК даптомицина и ванкомицина ( $R^2$  0,44 и 0,31, соответственно). Оба интегральных параметра –  $ABBC$  и  $I_E$  - одинаково четко коррелируют с ПФК<sub>0-∞</sub>/МПК даптомицина ( $R^2$  0,84 и 0,81, соответственно) и ванкомицина ( $R^2$  0,92 и 0,90, соответственно).

Проведенный анализ свидетельствует о меньшей информативности параметров  $T_{90\%}$ ,  $T_{99\%}$  и  $N_t$ , традиционно используемых при анализе кинетических кривых гибели/роста бактерий под действием антибиотиков, по сравнению с таковой параметров  $N_{мин}$ ,  $ABBC$  и  $I_E$ . Поскольку точечные параметры, к числу которых относятся и  $N_{мин}$ , характеризуются меньшей точностью, чем интегральные ( $ABBC$  и  $I_E$ ), которые отражают особенности кинетической кривой в целом,  $ABBC$  и  $I_E$  обладают преимуществами перед  $N_{мин}$ . Вместе с тем, параметр  $I_E$  предпочтительнее параметра  $ABBC$ , поскольку отражает всю совокупность наблюдаемых процессов – от гибели клеток до завершения периода их вторичного роста, - а  $ABBC$  может отражать лишь фрагмент кинетической кривой.

Полученные результаты сопоставления применимости различных параметров для установления зависимости «ПФК/МПК - антимикробный эффект» согласуются с описанными ранее в фармакодинамических исследованиях со фторхинолонами [Firsov A.A. et al., 1997]. В связи с этим, именно параметр  $I_E$  был использован в дальнейшей работе.

### **Фармакодинамика даптомицина и ванкомицина при моделировании фармакокинетических профилей, наблюдаемых после многократного введения антибиотиков**

С целью приближения к реальным условиям клинического применения антибиотиков (7-10-дневные курсы) фармакодинамику даптомицина и ванкомицина исследовали при их ежедневном введении в динамическую систему на протяжении 5 дней, варьируя значения ПФК<sub>24</sub>/МПК даптомицина и ванкомицина, вводимых соответственно 1 и 2 раза в сутки в 16-кратном диапазоне.

Как видно на рис. 6, кинетические кривые изменения численности клеток *S. aureus* 866 под воздействием даптомицина и ванкомицина имели сходный характер. По мере повышения ПФК<sub>24</sub>/МПК от 16 до 256 ч, величина  $N_{мин}$  систематически уменьшалась, а время возобновления роста бактерий возрастало. Особенно отчетливо это прослеживалось применительно к воздействию на клетки *S. aureus* 866 ванкоми-

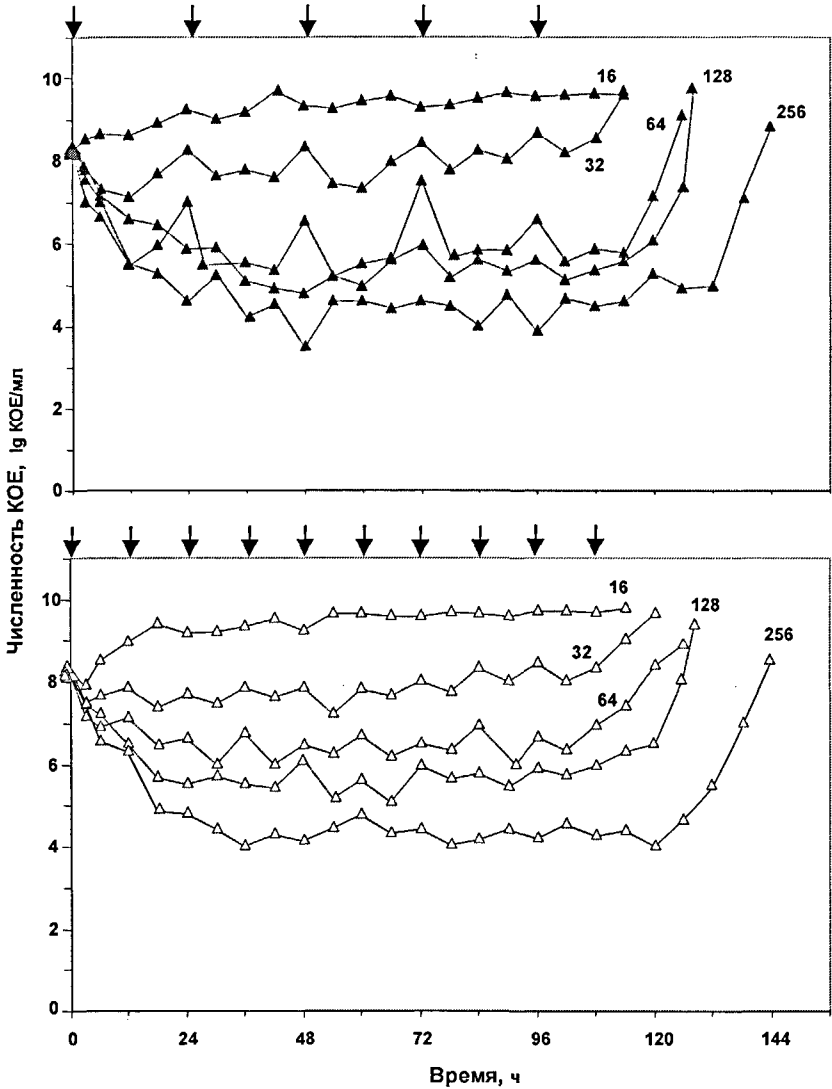


Рис. 6. Кинетика изменения численности клеток *S. aureus* 866 под действием даптомицина и ванкомицина. Стрелками указаны моменты введения антибиотиков, цифрами у кривых – моделируемые значения ПFK<sub>24</sub>/МПК (в часах). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

цина. Аналогичная закономерность отмечена и в опытах с *S. aureus* 10, хотя кинетические кривые носили менее регулярный характер.

Для количественной оценки антимикробного эффекта использовали параметр  $I_E$ , который в этом случае отражает кумулятивный эффект, достигающийся к концу

курсового введения антибиотика. Для каждой пары антибиотик – микроорганизм установлена зависимость  $I_E$  от ПФК<sub>24</sub>/МПК, которая отражает систематическое увеличение антистафилококкового эффекта по мере повышения ПФК<sub>24</sub>/МПК.

При каждом из смоделированных значений ПФК<sub>24</sub>/МПК эффекты даптомицина и ванкомицина, выраженные параметром  $I_E$ , практически не отличались (для *S. aureus* 866) или отличались незначительно (для *S. aureus*10). Это позволило объединить данные по обоим штаммам *S. aureus* и антибиотикам и аппроксимировать их уравнением сигмоиды (рис. 7).

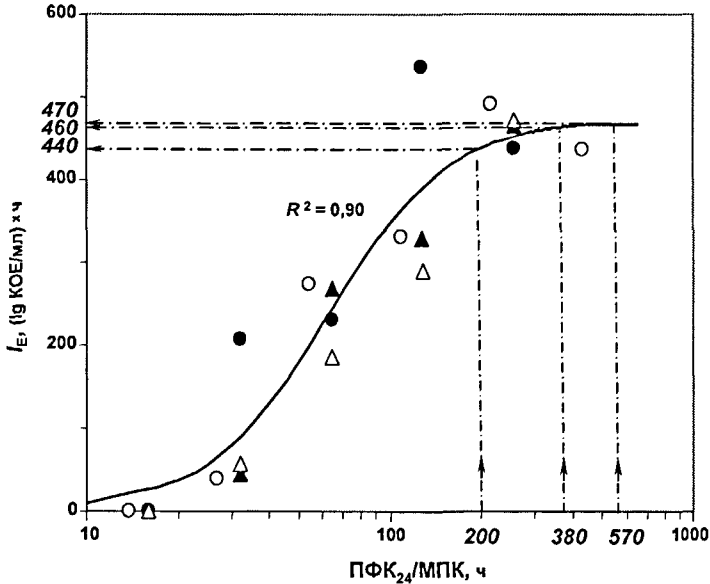


Рис. 7. Зависимость антистафилококковых эффектов даптомицина и ванкомицина от моделируемого значения ПФК<sub>24</sub>/МПК, описанная уравнением [3]. Обозначения те же, что на рис. 1.

Ввиду штаммо-независимого характера зависимости « $I_E$  - ПФК<sub>24</sub>/МПК», она может быть использована для прогнозирования антимикробных эффектов даптомицина и ванкомицина при терапевтических значениях ПФК<sub>24</sub>/МПК (создаются при клинических дозах антибиотиков) в отношении гипотетического штамма *S. aureus* с МПК, равной МПК<sub>90</sub>.

С учетом приведенных в литературе значений МПК<sub>90</sub> (1 мкг/мл для даптомицина и 2 мкг/мл для ванкомицина [Snydman D.R. et al., 2000]) терапевтические значения ПФК<sub>24</sub>/МПК для даптомицина составляют 380 ч (доза 4 мг/кг) и 570 ч (6 мг/кг), а для ванкомицина (2×1 г) - 200 ч. Как видно на рис. 7, прогнози-

руемая эффективность антибиотиков практически одинакова при столь разных значениях ПФК<sub>24</sub>/МПК, поскольку все они попадают в диапазон, соответствующий фазе насыщения эффекта.

**Устойчивость *S. aureus* к даптомицину и ванкомицину при моделировании их фармакокинетических профилей *in vitro***

С целью оценки влияния ПФК<sub>24</sub>/МПК на селекцию стафилококков, устойчивых к даптомицину и ванкомицину, моделируемые значения ПФК<sub>24</sub>/МПК были выбраны так, чтобы соответствующие максимальные концентрации антибиотиков были близки к МПК, находились в пределах между МПК и МПК<sub>М</sub>, т.е. внутри ОСМ, или превышали МПК<sub>М</sub>. Три фармакокинетические кривые, отвечающие этому критерию в наибольшей степени, показаны на рис. 8 (а) - на примере штамма *S. aureus* 866 при 5-дневном введении даптомицина. На том же рисунке представлены результаты популяционного анализа (рис.8 (б), (в)) и динамика изменения чувствительности *S. aureus* 866 к даптомицину (рис. 8 (г)).

Как видно на левой панели рисунка, при минимальном значении ПФК<sub>24</sub>/МПК, когда уровни антибиотика едва достигали МПК и на протяжении большей части интервала дозирования были вне ОСМ, ни селекции резистентных мутантов, ни потерь в чувствительности *S. aureus* 866 не было. Подобные результаты были получены и при максимальном значении ПФК<sub>24</sub>/МПК, когда уровни даптомицина превышали МПК<sub>М</sub> и также были за пределами ОСМ (правая панель рисунка). В то же время, при концентрациях даптомицина, находящихся внутри ОСМ на протяжении большей части интервала дозирования (ПФК<sub>24</sub>/МПК = 32 ч) происходила селекция даптомицино-устойчивых клеток и снижение их чувствительности, выраженное отношением МПК<sub>t</sub> (значение МПК в момент времени *t*) к МПК<sub>исх</sub> – центральная панель рис. 8.

Аналогичная взаимосвязь наблюдалась между селекцией антибиотико-устойчивых клеток *S. aureus* 866 и моделируемым значением ПФК<sub>24</sub>/МПК ванкомицина.

Подобным образом, наиболее выраженная селекция резистентных клеток *S. aureus* 10 с сопутствующим снижением их чувствительности к даптомицину или ванкомицину происходила только тогда, когда их концентрации были внутри ОСМ, но не вне его.

Для установления зависимости между селекцией резистентных мутантов *S. aureus* от ПФК<sub>24</sub>/МПК, результаты популяционного анализа были выражены логарифмически.



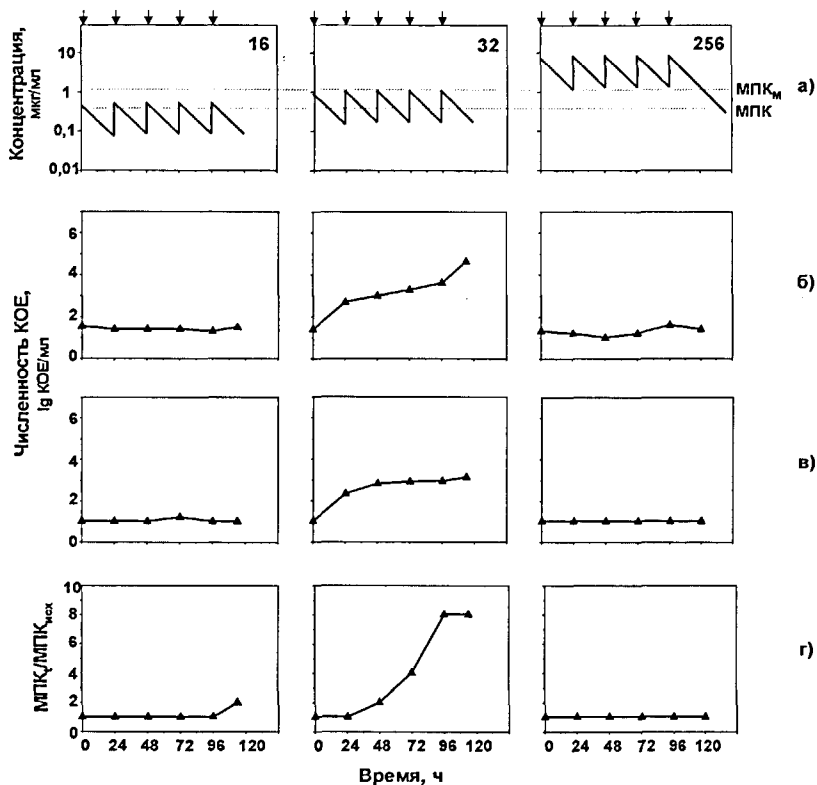


Рис. 8. Фармакокинетические профили даптомицина (а), а также кривые роста клеток *S. aureus* 866 на чашках, содержащих даптомицин в концентрациях 2×МПК (б) и 4×МПК (в) и динамика изменения чувствительности *S. aureus* 866, выраженная отношением МПК<sub>макс</sub>/МПК<sub>исх</sub> (г). Цифрами на графиках обозначены моделируемые значения ПФК<sub>24</sub>/МПК (в часах).

рифмом отношения максимальной численности клеток стафилококка ( $N_{\text{макс}}$ ) в агаризованной среде, содержащей даптомицин или ванкомицин, к исходной численности жизнеспособных клеток ( $N_{\text{исх}}$ ). Динамика изменений чувствительности стафилококков под воздействием антибиотиков была выражена отношением МПК<sub>кон</sub> к МПК<sub>исх</sub>.

Как видно на рис. 9, применительно к селекции клеток *S. aureus* 866 и 10, устойчивых к 2×МПК даптомицина или ванкомицина, зависимость логарифма отношения  $N_{\text{макс}}/N_{\text{исх}}$  от моделируемого значения ПФК<sub>24</sub>/МПК оказалась сходной (рис. 9 (а)).

По мере повышения ПФК<sub>24</sub>/МПК значения  $\lg(N_{\text{макс}}/N_{\text{исх}})$  вначале увеличивались, достигая максимума в интервале от 32 до 64 ч, а затем уменьшались.

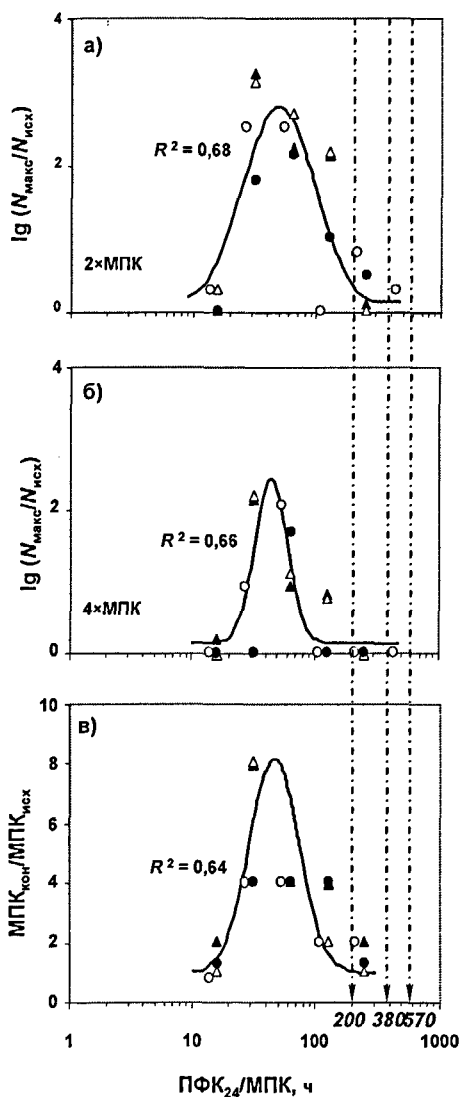


Рис. 9. Зависимость селекции клеток *S. aureus*, устойчивых к 2×МПК (а) и 4×МПК (б) даптомицина и ванкомицина, а также изменений чувствительности (в), от моделируемого значения ПФК<sub>24</sub>/МПК, описанная уравнением [4]. Обозначения те же, что на рис. 1.

селекции устойчивых мутантов любого штамма *S. aureus*, в том числе уже

Это обстоятельство позволило сгруппировать данные и аппроксимировать их уравнением [4].

Подобно описанному для фторхинолонов [Фирсов А.А. и соавт., 2004; Firsov A.A. et al., 2003], график зависимости  $\lg(N_{\text{макс}}/N_{\text{исх}})$  от ПФК<sub>24</sub>/МПК для липо- и гликопептида имеет куполообразную форму. Та же форма была характерна и для зависимости « $\lg(N_{\text{макс}}/N_{\text{исх}})$  – ПФК<sub>24</sub>/МПК» применительно к клеткам, устойчивым к 4×МПК даптомицина или ванкомицина (рис. 9 (б)), с максимумом в интервале значений ПФК<sub>24</sub>/МПК от 32 ч до 64 ч. Подобная зависимость от ПФК<sub>24</sub>/МПК была установлена и для отношения МПК<sub>кон</sub>/МПК<sub>исх</sub> (рис. 9 (в)).

Как видно на рис. 9, селекция устойчивых клеток *S. aureus* происходит в интервале значений ПФК<sub>24</sub>/МПК, ограниченном 30 и 100-200 ч («диапазон резистентности»). При меньших и более высоких значениях ПФК<sub>24</sub>/МПК резистентность стафилококков не выявляется.

Будучи штаммо-независимыми, установленные соотношения между резистентностью и отношением ПФК<sub>24</sub>/МПК, могут быть использованы для прогнозирования

упомянутого выше гипотетического штамма, для которого значения МПК даптомицина и ванкомицина равны соответствующим значениям МПК<sub>90</sub>.

Как видно на рис. 9, терапевтические значения ПФК<sub>24</sub>/МПК даптомицина (380 и 570 ч) для такого штамма находятся за пределами «диапазона резистентности». Что касается терапевтического значения ПФК<sub>24</sub>/МПК ванкомицина (200 ч), оно практически совпадает с верхней границей указанного диапазона. В связи с этим вероятность селекции резистентных стафилококков при ванкомицинотерапии выше, чем при использовании даптомицина.

Анализ описанных выше результатов свидетельствует об относительно слабой выраженности процессов селекции устойчивых мутантов *S. aureus*. Так, к концу 5-дневного введения даптомицина численность клеток, резистентных к 2× и 4×МПК антибиотика, возросла лишь на 2-3 порядка, а МПК – в 6-8 раз (2-3 шага при серийных разведениях).

Для того чтобы понять, чреваты ли эти изменения дальнейшим отбором резистентных мутантов и снижением их чувствительности при более длительном применении даптомицина, в динамической системе были смоделированы режимы 10-дневного введения антибиотика при значениях ПФК<sub>24</sub>/МПК, которые ассоциировались с максимальной селекцией мутантов в 5-дневных экспериментах (ПФК<sub>24</sub>/МПК = 32 или 64 ч).

Как видно на рис. 10 (а), на всем протяжении 10-дневного курса введения даптомицина (ПФК<sub>24</sub>/МПК = 64 ч) численность клеток *S. aureus* ATCC 43300,

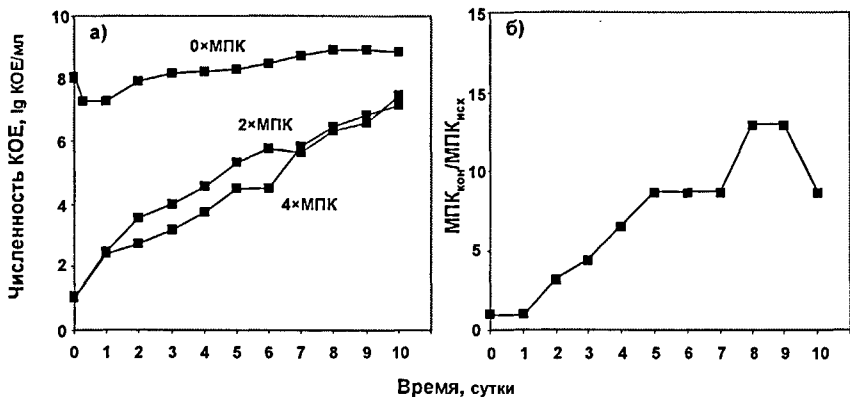


Рис. 10. Кинетические кривые изменения численности клеток *S. aureus* ATCC 43300 (а), на чашках, не содержащих (0×МПК) и содержащих даптомицин (2×МПК и 4×МПК), а также динамика изменений чувствительности клеток (б) при моделировании значения ПФК<sub>24</sub>/МПК, равного 64 ч.

устойчивых к 2х и 4хМПК антибиотика, систематически возрастала, достигая к концу эксперимента  $\sim 10^7$  КОЕ/мл. Если на 5-й день наблюдения она превышала исходную на 4-5 порядков, то на 10-й - на 6 порядков. Сопутствующие изменения чувствительности клеток *S. aureus* ATCC 43300 к даптомицину также характеризовались постепенным повышением значений МПК – в 9 раз как на 5-й, так и на 10-й день (рис. 10 (б)). При моделировании значения ПФК<sub>24</sub>/МПК даптомицина, равного 32 ч, изменения численности резистентных клеток стафилококка и их чувствительности к даптомицину были аналогичными.

Таким образом, относительно небольшая продукция резистентных стафилококков, наблюдаемая при моделировании 5-дневного введения даптомицина, является предвестником значительного возрастания их численности при последующих введениях. С другой стороны, удлинение продолжительности введения даптомицина с 5 до 10 дней сопровождалось лишь количественными (но не качественными) изменениями в популяции – чем продолжительнее воздействие антибиотика, тем больше устойчивых мутантов и тем ниже чувствительность. Более того, различия в потерях чувствительности стафилококка на 5-й и 10-й дни оказались относительно незначительными.

Анализ полученных данных позволяет предположить, что 5-дневные эксперименты достаточно объективно отражают динамику даптомицино-резистентности в бактериальной популяции.

#### **Фармакодинамика даптомицина и его способность к предотвращению селекции резистентных стафилококков при сочетанном применении с рифампицином**

Как было отмечено выше, селекция стафилококков, резистентных к даптомицину и ванкомицину, наблюдалась при значениях ПФК<sub>24</sub>/МПК, равных 32 – 64 ч, которые ниже соответствующих терапевтических значений ПФК<sub>24</sub>/МПК<sub>90</sub>, по крайней мере, для даптомицина. Вместе с тем, в процессе клинического применения даптомицина терапевтические значения ПФК<sub>24</sub>/МПК<sub>90</sub> могут постепенно снижаться (как это произошло в результате длительного использования ванкомицина). В таких случаях единственным выходом из положения является комбинированная антибиотикотерапия. Для того чтобы оценить перспективы снижения риска развития устойчивости стафилококков к даптомицину при его сочетанном применении с другими противо-стафилококковыми антибиотиками, изучена селекция резистентных мутантов на примере комбинации даптомицина с рифампицином.

Фармакодинамическое взаимодействие даптомицина (ПФК<sub>24</sub>/МПК = 64 ч) и рифампицина (ПФК<sub>24</sub>/МПК = 100 и 500 ч) выразилось в значительно более быстром и резком снижении численности чувствительных к ним клеток *S. aureus* 866, чем при использовании антибиотиков по отдельности (рис. 11 (а)).

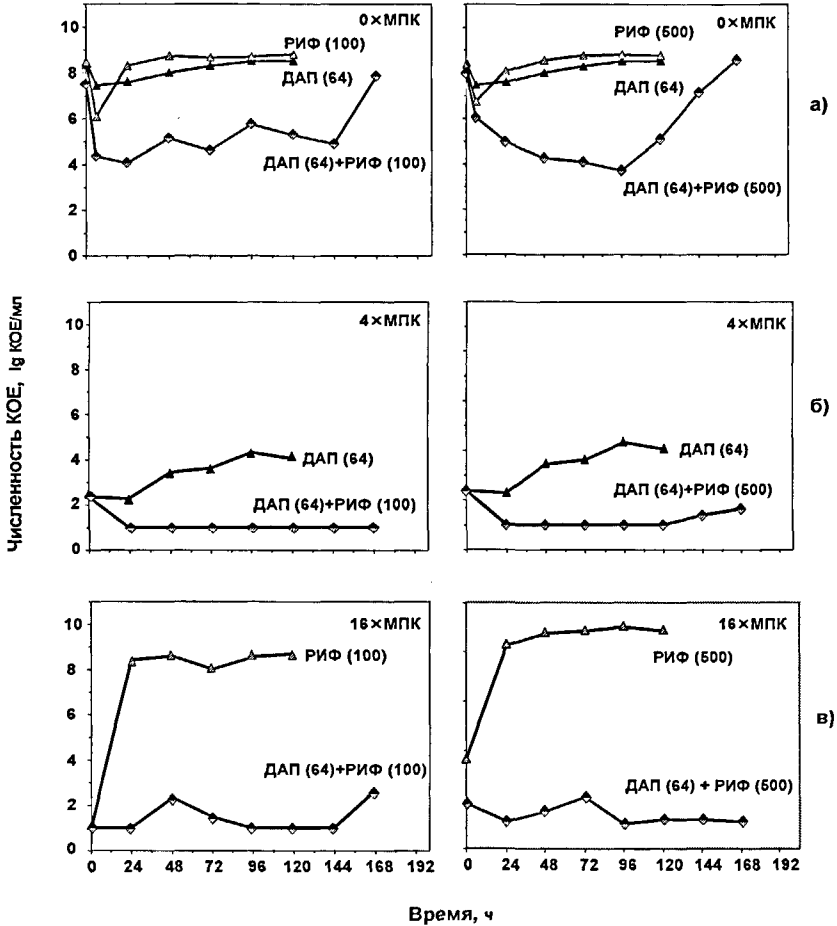


Рис. 11. Кинетика изменения численности клеток *S. aureus* 866 под действием даптомицина (ДАП) и рифампицина (РИФ), используемых по отдельности и в комбинации: а) – чувствительных, б) – устойчивых к 4xМПК даптомицина, в) – устойчивых к 16xМПК рифампицина. Цифры в скобках отражают моделируемое значение ПФК<sub>24</sub>/МПК (в часах).

В результате сочетанного применения даптомицина с рифампицином не только снижалась минимальная численность жизнеспособных клеток *S. aureus* 866, но и увеличивалась длительность проявления антимикробного эффекта.

Та же закономерность была отмечена и для *S. aureus* ATCC 43300. При этом влияние рифампицина на наблюдаемый антимикробный эффект было тем большим, чем выше была доля рифампицина в комбинации. Так, при сочетанном применении даптомицина с рифампицином в большей дозе (ПФК<sub>24</sub>/МПК = 500 ч) их антимикробный эффект ( $I_E$ ) в отношении *S. aureus* 866 возрастал в 15 раз, а в меньшей дозе (ПФК<sub>24</sub>/МПК = 100 ч) – в 10 раз по сравнению с величиной  $I_E$  при введении даптомицина без рифампицина. Применительно к *S. aureus* ATCC 43300, соответствующее увеличение  $I_E$  было 60- и 30- кратным.

Сочетанное применение даптомицина с рифампицином приводило к замедлению (*S. aureus* ATCC 43300) или к предотвращению (*S. aureus* 866) селекции даптомицинорезистентных мутантов. Если на фоне введения даптомицина численность устойчивых мутантов *S. aureus* 866 неуклонно возрастала, то в присутствии рифампицина она снижалась относительно исходного уровня (рис. 11 (б)). Соответственно, величина  $AUBC_M$ , характеризующая интенсивность продукции мутантов, устойчивых к 4×МПК даптомицина, при моделировании комбинированного применения антибиотиков была меньше установленной при введении даптомицина отдельно на 5-34% (*S. aureus* ATCC 43300) и 64-66% (*S. aureus* 866).

В целом, комбинация даптомицина с рифампицином сильнее снижала селекцию даптомицинорезистентных мутантов *S. aureus* 866, чем мутантов *S. aureus* ATCC 43300, причем эффективность этой комбинации не зависела от моделируемого значения ПФК<sub>24</sub>/МПК рифампицина.

В свою очередь, даптомицин оказывал воздействие на процессы селекции рифампицинорезистентных стафилококков. Как видно на рис. 11 (в), в отличие от быстрого замещения чувствительных к рифампицину клеток *S. aureus* 866 устойчивыми, отмеченного при его введении отдельно, численность рифампицинорезистентных мутантов при сочетанном применении рифампицина с даптомицином незначительно отличалась от исходной на протяжении всего периода наблюдения. Аналогичный эффект комбинации отмечен в экспериментах с *S. aureus* ATCC 43300. Под влиянием даптомицина величина  $AUBC_M$ , характеризующая численность мутантов *S. aureus* ATCC 43300 и *S. aureus* 866, устойчивых к 16×МПК рифампицина, снижалась соответственно на 59-71% и 80-82%.

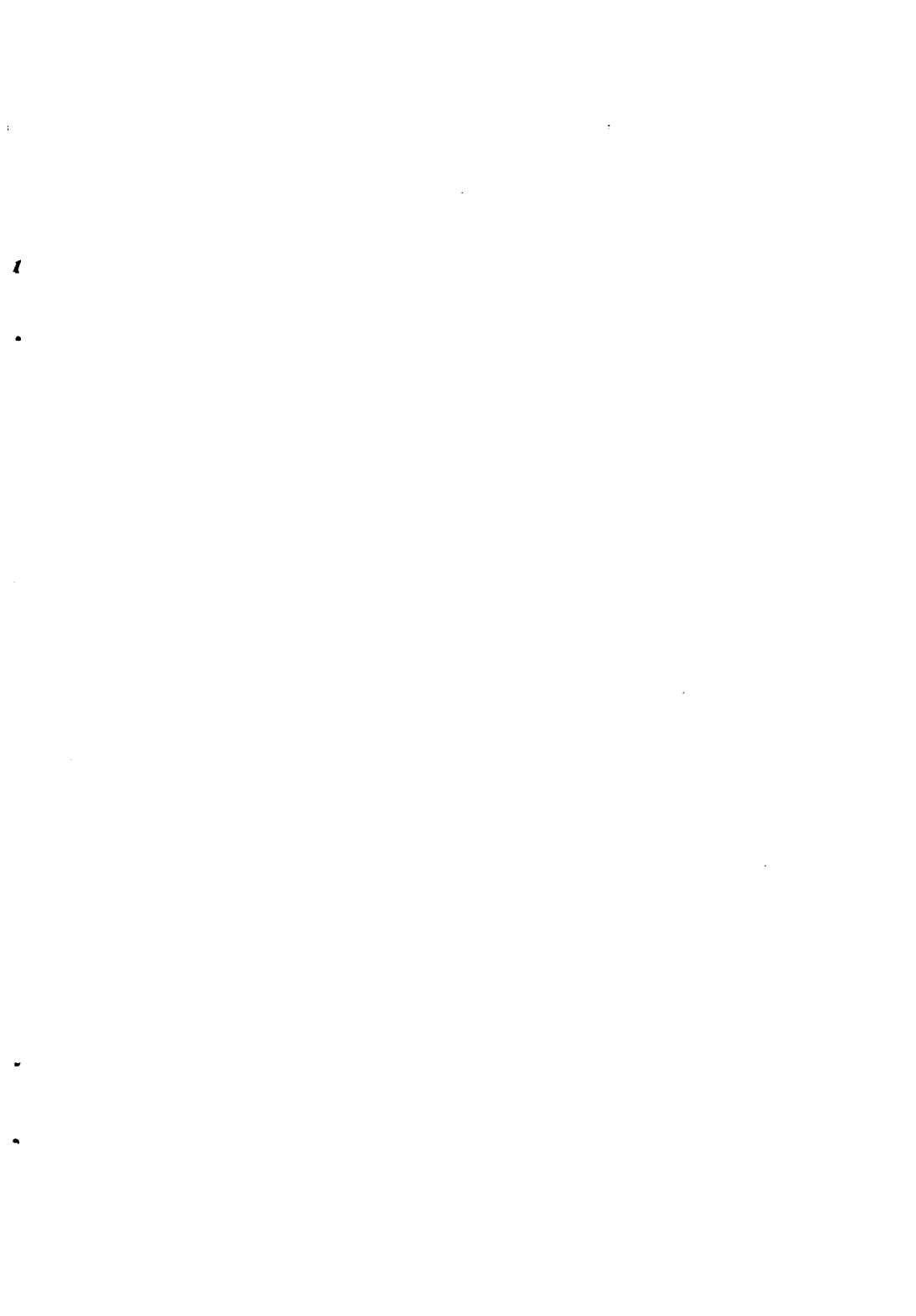
**ВЫВОДЫ:**

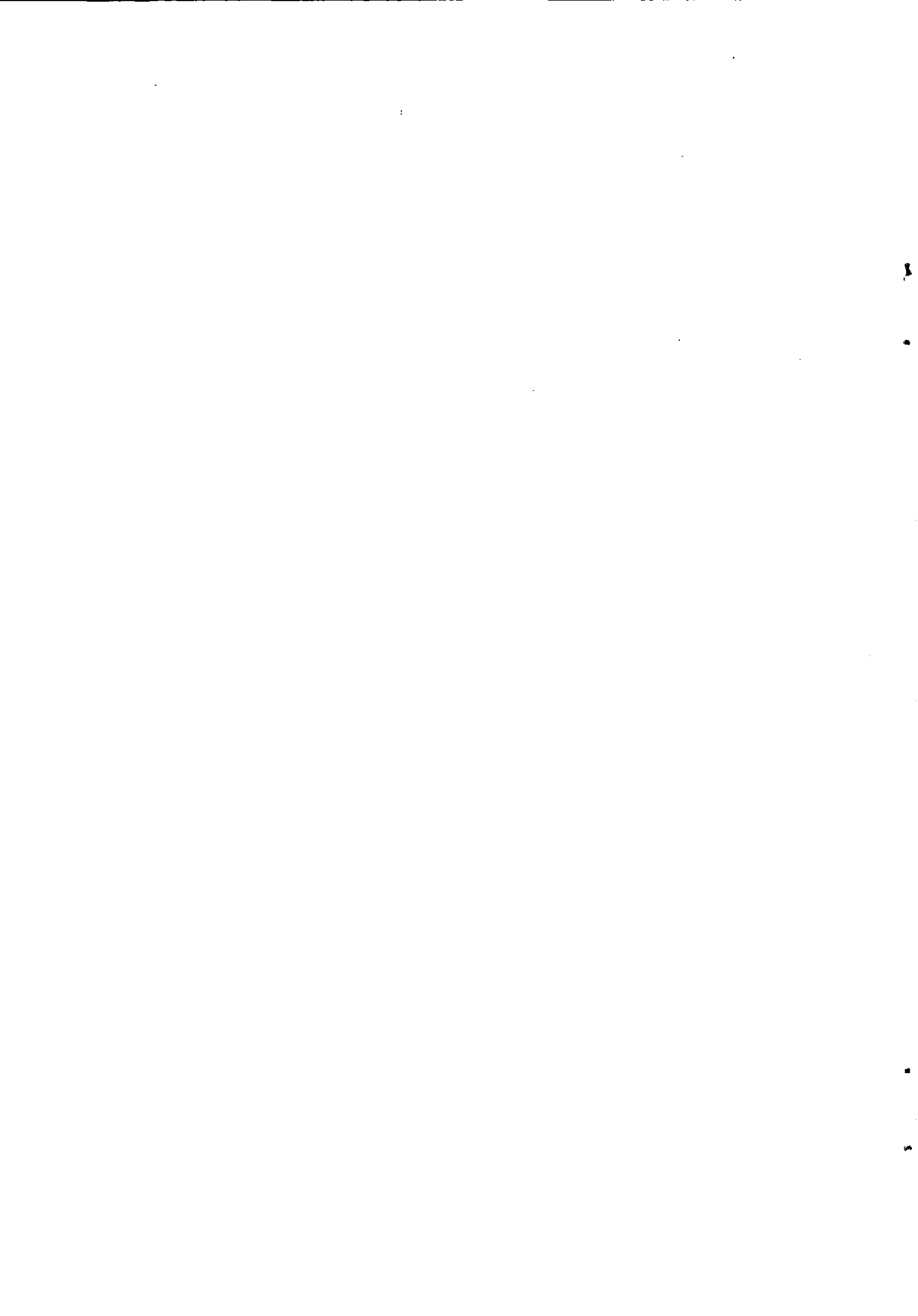
1. На примере изучения фармакодинамики даптомицина и ванкомицина в динамической системе *in vitro* доказано, что оптимальным параметром, отражающим степень и длительность антистафилококкового эффекта, является площадь между кривыми изменения численности колониеобразующих единиц в присутствии и в отсутствие антибиотика ( $I_E$ ).
2. При моделировании режимов многократного введения даптомицина и ванкомицина установлена зависимость  $I_E$  от отношения площади под фармакокинетической кривой в пределах 24 ч к минимальной подавляющей концентрации (ПФК<sub>24</sub>/МПК), которая оказалась неспецифичной как для штаммов *Staphylococcus aureus*, так и для антибиотиков.
3. Зависимость « $I_E$  – ПФК<sub>24</sub>/МПК» позволяет осуществлять прогноз эффективности даптомицина и ванкомицина при стафилококковой инфекции, согласно которому их терапевтические значения ПФК<sub>24</sub>/МПК могут обеспечивать одинаковый антистафилококковый эффект.
4. Оптимизированы условия выявления мутантов *S. aureus*, резистентных к даптомицину и ванкомицину, - моделирование 5-дневного введения антибиотиков, популяционный анализ с ежедневной оценкой антибиотико-чувствительности.
5. Доказано, что селекция резистентных стафилококков происходит только при концентрациях антибиотиков, попадающих в «окно селекции мутантов» (ОСМ).
6. Установлена зависимость резистентности от ПФК<sub>24</sub>/МПК, инвариантная относительно бактериального штамма и антибиотика.
7. Прогнозированное с помощью указанной зависимости антимутантное значение ПФК<sub>24</sub>/МПК (200 ч) для даптомицина оказалось в 2-3 раза ниже терапевтических (380-570 ч), а для ванкомицина - соизмеримым с терапевтическим (200 ч).
8. Продемонстрирована принципиальная возможность предотвращения селекции даптомицинорезистентных стафилококков путем сочетанного применения даптомицина с рифампицином при субтерапевтических значениях ПФК<sub>24</sub>/МПК.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Востров С.Н., Лубенко И.Ю., Смирнова М.В., Фирсов А.А. Прогноз развития устойчивости стафилококков к 8 антибиотикам по концентрации, предотвращающей селекцию мутантов. // Клини. Микробиол. Антимикроб. Терапия, 2005, т. 7 (Прилож. 1), с. 18.
2. Firsov A.A., Alferova I.V., Smirnova M.V., Lubenko I.Yu., Vostrov S.N., Mirchink E.P., Portnoy Yu.A., Zinner S.H. Relative abilities of daptomycin (DAP) and vancomycin (VAN) to prevent the enrichment of resistant *Staphylococcus aureus* mutants in an in vitro dynamic model. // Clin. Microbiol. Infection, 2005, v. 11, Suppl. 2, p. 518.
3. Smirnova M.V., Alferova I.V., Lubenko I.Yu., Vostrov S.N., Zinner S.H., Firsov A.A. Daptomycin and vancomycin pharmacodynamics with differentially susceptible *Staphylococcus aureus*: multiple-dose simulations using an in vitro dynamic model. // J. Chemotherapy, 2005, v. 17, Suppl. 3, p. 8.
4. Смирнова М.В., Алферова И.В., Востров С.Н., Лубенко И.Ю., Портной Ю.А., Фирсов А.А. Сравнительная фармакодинамика антистафилококкового эффекта даптомицина и ванкомицина в динамической системе in vitro. // Клини. Микробиол. Антимикроб. Терапия, 2006, т. 8, №2, с. 186-192.
5. Firsov A.A., Smirnova M.V., Lubenko I.Yu., Vostrov S.N., Portnoy Yu.A. Testing the mutant selection window hypothesis with *Staphylococcus aureus* exposed to daptomycin and vancomycin in an in vitro dynamic model. // J. Antimicrob. Chemotherapy, 2006, Vol. 58 (6), p. 1185-1190.
6. Smirnova M.V., Lubenko I. Yu., Portnoy Y. A., Zinner S. H., Firsov A.A. Concentration-response relationships as a basis for choice of the optimal endpoints of the antimicrobial effect: daptomycin and vancomycin pharmacodynamics with staphylococci in an in vitro dynamic model. // Int. J. Antimicrob. Agents, 2007, Vol. 29, p. 165-169.







Тираж: 100 экз.

2008A

2-60086008