

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПО
ИЗЫСКАНИЮ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ ИМЕНИ Г.Ф.ГАУЗЕ»

На правах рукописи

Алиева Камилла Натиговна

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РАЗВИТИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS
В ЭКСПЕРИМЕНТАХ С ЛИНЕЗОЛИДОМ
И ЕГО КОМБИНАЦИЕЙ С ДАПТОМИЦИНОМ
В ДИНАМИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ *IN VITRO***

Специальность 14.03.07 – Химиотерапия и антибиотики

Диссертация на соискание учёной степени

Кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук,

Профессор Фирсов А. А.,

Кандидат биологических наук,

Голикова М. В.

Москва, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Проблема устойчивости бактерий к антибиотикам: текущее состояние и пути решения	13
1.2 Динамическая система <i>in vitro</i>	19
1.2.1 Воспроизведение моноэкспоненциального фармакокинетического профиля антибиотика в динамической системе <i>in vitro</i>	20
1.2.2 Одновременное воспроизведение фармакокинетических профилей двух антибиотиков с различными периодами полувыведения	23
1.2.3 Возможности и ограничения исследований в динамической системе <i>in vitro</i>	26
1.3 Фармакокинетико-фармакодинамические исследования в динамических системах <i>in vitro</i> при моделировании режимов монотерапии	29
1.3.1 Зависимость между антимикробным эффектом и концентрацией антибиотика, прогнозирование эффективности антибиотиков в клинике..	29
1.3.2 Изучение процессов развития резистентности бактерий к антибиотикам, применимость гипотезы окна селекции мутантов (ОСМ)..	33
1.3.3 Фармакокинетико-фармакодинамические параметры для прогнозирования развития резистентности бактерий к антибиотикам.....	45
1.4 Фармакокинетико-фармакодинамические исследования в динамических системах <i>in vitro</i> при моделировании комбинированной терапии линезолидом и даптомицином	55
1.4.1 Применение линезолида и даптомицина в комбинации при лечении инфекционных заболеваний в клинике.....	55
1.4.2 Изучение фармакодинамики линезолида и даптомицина в комбинации <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	56
1.4.3 Изучение эффекта комбинации линезолида и даптомицина в отношении устойчивых клеток бактерий <i>in vitro</i>	58

1.5 Линезолид и даптомицин: характеристика антибиотиков.....	64
1.5.1 Линезолид	64
1.5.2 Даптомицин	68
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	72
2.1 Питательные среды, вспомогательное оборудование, расходные материалы и антибиотики	72
2.2 Бактериальные штаммы.....	74
2.3 Оценка чувствительности <i>S. aureus</i> к антибиотикам. Определение МПК и МПК _М	76
2.4 Моделируемые фармакокинетические профили антибиотиков	77
2.5 Динамическая система <i>in vitro</i>	80
2.5.1 Динамическая система для воспроизведения фармакокинетического профиля антибиотика.....	80
2.5.2 Динамическая система для одновременного воспроизведения фармакокинетических профилей двух антибиотиков	82
2.6 Воспроизводимость фармакокинетических профилей линезолида и даптомицина	84
2.7 Регламент эксперимента. Оценка противомикробного эффекта и развития устойчивости	86
2.8 Анализ зависимости противомикробного эффекта и селекции устойчивых мутантов <i>S. aureus</i> от фармакодинамических параметров	88
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	89
ГЛАВА 3. ФАРМАКОДИНАМИКА ЛИНЕЗОЛИДА В ОТНОШЕНИИ УСТОЙЧИВЫХ И ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К НЕМУ КЛЕТОК <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	89
3.1 Лабораторная селекция устойчивых мутантов <i>S. aureus</i>	89
3.2 Определение МПК и МПК _М линезолида	91
3.3 Фармакодинамика линезолида в отношении устойчивых к нему клеток <i>S. aureus</i>	93

3.4 Поиск оптимального предиктора развития устойчивости <i>S. aureus</i> к линезолиду	99
3.5 Фармакодинамика линезолида в отношении общей популяции клеток <i>S. aureus</i>	107
ГЛАВА 4. ФАРМАКОДИНАМИКА ЛИНЕЗОЛИДА И ДАПТОМИЦИНА ПО ОТДЕЛЬНОСТИ И В КОМБИНАЦИИ В ОТНОШЕНИИ УСТОЙЧИВЫХ И ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	110
4.1 Определение МПК _М и МПК линезолида и даптомицина	111
4.2 Фармакодинамика комбинации линезолида с даптомицином в отношении устойчивой субпопуляции <i>S. aureus</i>	112
4.3 Фармакодинамика линезолида, даптомицина и их комбинации в отношении общей популяции <i>S. aureus</i>	123
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	128
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	140
ВЫВОДЫ.....	141
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	142
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	145
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	166

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Снижение чувствительности возбудителей инфекционных заболеваний к старым антибиотикам на фоне замедления темпов создания новых препаратов – это серьёзная проблема современного здравоохранения. Одним из путей предотвращения развития устойчивости бактерий к антибиотикам является оптимизация их применения. В основе оптимизации антибиотикотерапии лежит знание зависимости «резистентность – концентрация». До настоящего времени данные о развитии резистентности возбудителей инфекционных заболеваний, полученные в клинике, не удалось связать с фармакокинетическими параметрами антимикробных препаратов. Одним из перспективных направлений исследований, которое позволяет изучать такие зависимости, является фармакокинетико-фармакодинамическое моделирование, основным инструментом которого являются динамические системы *in vitro*. При помощи таких систем оказывается возможным изучать закономерности развития резистентности бактерий под воздействием антибиотика в условиях его меняющейся концентрации так, как это происходит у человека. Исследования в динамических системах позволяют: устанавливать зависимость между резистентностью и фармакокинетико-фармакодинамическими параметрами антибиотика, прогнозировать развитие резистентности бактерий при клинических режимах антибиотикотерапии, определять пороговые значения фармакокинетико-фармакодинамических параметров, при которых наблюдается подавление развития резистентности бактерий. На сегодняшний день наиболее подробно в этом аспекте были изучены антибиотики группы фторхинолонов. По результатам исследований с этими антибиотиками была выдвинута гипотеза существования «окна селекции мутантов» (Zhao, Drlica, 2001; Drlica, 2003) и неоднократно подтверждена ее применимость (Firsov et al., 2003, 2013; Zinner et al., 2003,

2013; Tam et al., 2007; Gebru et al., 2011). Согласно данной гипотезе обогащение микробной популяции устойчивыми клетками наиболее вероятно, когда концентрации воздействующего на неё антибиотика находятся в диапазоне, нижний предел которого – минимальная подавляющая концентрация препарата в отношении микроорганизма-мишени (МПК), а верхний – минимальная концентрация, предотвращающая рост устойчивых мутантов, присутствующих в бактериальной популяции (МПК_М). После того как гипотеза «окна селекции мутантов» (ОСМ) была сформулирована, в исследованиях с фторхинолонами впервые был установлен куполообразный вид зависимости между резистентностью и ПФК/ПМК или ПФК/МПК_М (площадью под фармакокинетической кривой изменения концентрации антибиотика, ПФК, отнесённой, соответственно, к МПК или МПК_М данного препарата в отношении микроорганизма-мишени) (Firsov 2003, Tam et al., 2007; Gebru et al., 2011; Firsov et al., 2013, 2014, 2015a; Strukova et al., 2015, 2016). Кроме того, были проведены многочисленные исследования, направленные на поиск оптимального фармакокинетико-фармакодинамического параметра, применимого для прогнозирования развития резистентности к фторхинолонам при разных режимах их применения, в том числе клинических (Homma et al., 2007; Firsov et al., 2008b, 2013; Liang et al., 2011; Gebru et al., 2011; Strukova et al., 2016a, 2016b). Применительно к антибиотикам других классов эти вопросы во многом остались нерешёнными. В этой связи проведение подобных исследований с другими препаратами, в частности, с антибиотиками новых классов, например, линезолидом, весьма актуально. Это приобретает особую важность в связи с систематическим появлением новых сообщений о выделении в клинике резистентных к линезолиду энтерококков (Seedat et al., 2006; Knoll et al., 2013; de Almeida et al., 2014; Yu et al., 2014) и стафилококков (Locke et al., 2009a; Yoshida et al., 2009; Hill et al., 2010; Ikeda-Dantsuji et al., 2011).

Комбинированное применение антибиотиков – один из путей борьбы с развитием резистентности к ним бактерий. Как было показано в ряде исследований, проведённых с применением динамических систем *in vitro*, использование комбинаций препаратов, в составе которых был линезолид, позволяет подавить развитие резистентности бактерий, наблюдаемое при применении линезолида в отдельности (Firsov et al., 2017; Zinner et al., 2018).

В связи с вышесказанным установление зависимости между развитием резистентности к линезолиду и его концентрацией, а также оценка возможности подавления селекции устойчивых мутантов на фоне комбинированного применения линезолида с антибиотиками других групп в динамических системах *in vitro* представляется весьма актуальным.

Цель работы

Прогнозирование риска развития резистентности *S. aureus* к линезолиду, а также изучение эффекта комбинации линезолида с даптомицином в отношении общей популяции и резистентной субпопуляции золотистого стафилококка в динамической системе *in vitro*.

Задачи исследования

1. Проверить применимость гипотезы существования «окна селекции мутантов» к паре «линезолид – *S. aureus*».
2. Установить зависимость между развитием резистентности золотистого стафилококка к линезолиду и его концентрацией, выраженной при помощи фармакокинетико-фармакодинамических параметров, и выбрать оптимальный параметр для прогнозирования селекции устойчивых к линезолиду мутантов *S. aureus*.
3. Оценить вероятность селекции устойчивых мутантов *S. aureus* при моделировании режима дозирования линезолида, соответствующего терапевтическому.

4. Оценить возможность подавления развития резистентности *S. aureus* при использовании линезолида в комбинации с даптомицином.

5. Оценить применимость различных фармакокинетико-фармакодинамических параметров для прогнозирования риска развития резистентности *S. aureus* на фоне применения линезолида в комбинации с даптомицином.

Научная новизна

Впервые установлены зависимости между селекцией устойчивых к линезолиду мутантов *S. aureus* и фармакокинетико-фармакодинамическими параметрами.

Впервые установлено, что для прогнозирования воздействия линезолида на устойчивые субпопуляции *S. aureus* наиболее применимы параметры ПФК/МПК_М и $T_{>МПКМ}$ (время в % от интервала дозирования, в течение которого концентрация антибиотика превышает уровень МПК_М).

Впервые установлено, что применение линезолида и даптомицина в комбинации позволяет предотвратить селекцию устойчивых к ним мутантов *S. aureus*, наблюдаемую при использовании каждого из препаратов в отдельности.

Впервые доказана применимость параметра $T_{>МПКМ}$ и интегрального параметра, определяемого как площадь, ограниченная фармакокинетическим профилем антибиотика и его МПК_М (ПОМПК_М), для прогнозирования вероятности развития резистентности *S. aureus* к линезолиду и даптомицину при их сочетанном применении.

Теоретическая и практическая значимость работы

Подтверждение применимости гипотезы существования «окна селекции мутантов» в отношении всё большего числа пар антибиотик-бактерия свидетельствует о том, что развитие резистентности бактерий к антибиотикам разных классов происходит в соответствии с одними и теми же

закономерностями. Знание этих закономерностей, а также зависимостей «резистентность – концентрация», является основой оптимизации режимов антибиотикотерапии с целью предотвращения развития резистентности бактерий.

В настоящей работе была подтверждена применимость гипотезы «окна селекции мутантов» в отношении пары «линезолид – *S. aureus*». Кроме того, применимость данной гипотезы была впервые подтверждена в отношении комбинации линезолида с даптомицином и *S. aureus*. Установлены функциональные зависимости между развитием резистентности и фармакокинетико-фармакодинамическими параметрами. На основании анализа этих зависимостей выбраны параметры, которые можно использовать для прогнозирования развития резистентности золотистого стафилококка к линезолиду – ПФК/МПК_М и $T_{>МПК_М}$, и к комбинации линезолида с даптомицином – $T_{>МПК_М}$ и ПОМПК_М. Определены пороговые значения МПК_М линезолида в отношении изученных штаммов золотистого стафилококка. Эти пороговые значения могут быть применены для оценки возможности развития резистентности у других штаммов этого вида при монотерапии линезолидом. Отмечен выраженный эффект сочетания линезолида и даптомицина в отношении резистентных клеток *S. aureus* («антимутантный» эффект). Как показало настоящее исследование, применение линезолида в комбинации с даптомицином при терапии стафилококковых инфекций может снизить риск развития устойчивости *S. aureus*.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Гипотеза существования «окна селекции мутантов» применима к линезолиду и представителю грамположительных бактерий – *S. aureus*: интенсивность селекции устойчивых к линезолиду мутантов *S. aureus* зависит от положения фармакокинетического профиля антибиотика относительно «окна селекции мутантов».

2. Параметры ПФК/МПК_М и $T_{>МПКМ}$ являются оптимальными для прогнозирования развития резистентности золотистого стафилококка к линезолиду. Зависимость между развитием резистентности стафилококка к линезолиду и параметрами ПФК/МПК_М или $T_{>МПКМ}$ описывается функцией Гаусса или сигмоидной функцией, соответственно.

3. Развитие резистентности *S. aureus* к линезолиду, наблюдаемое при его применении в дозе, соответствующей терапевтической, можно предотвратить путём его сочетанного применения с даптомицином. Развитие резистентности *S. aureus* к даптомицину также подавляется под действием данной комбинации. Эффект комбинации в отношении общей популяции *S. aureus* сравним с таковым даптомицина.

4. Параметры $T_{>МПКМ}$ и ПОМПК_М можно использовать для прогнозирования вероятности развития резистентности бактерий при комбинированном применении линезолида и даптомицина.

Личный вклад автора

Автор, Алиева Камилла Натиговна, провела обзор, анализ и систематизацию научно-методической литературы, посвященной проблематике работы. Автор определила значения МПК и МПК_М антибиотиков в отношении исследуемых штаммов *S. aureus*, провела лабораторную селекцию мутантов *S. aureus*, выполнила эксперименты с *S. aureus* в динамической системе *in vitro*, моделирующей фармакокинетику линезолида и даптомицина при их введении в отдельности или в комбинации. Обработала и проанализировала результаты экспериментов.

Разработка и постановка экспериментальных научных исследований, изложенных в диссертационной работе, а также анализ полученных результатов исследовательской работы были выполнены автором самостоятельно под руководством д.б.н., профессора Фирсова Александра Алексеевича и к.б.н. Голиковой Марии Владимировны.

Апробация работы

Основные положения были представлены на международных конгрессах European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), проходивших в Амстердаме (2016 и 2019 г), Вене (2017 г), Мадриде (2018 г); международной онлайн конференции FEMS Online Conference on Microbiology 2020; Научно-практической конференции молодых учёных «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний» (Москва, 2018); Научной конференции с международным участием «Вакцинология как ответ биологическим угрозам», посвящённой 100-летию основания НИИВС им. И.И. Мечникова, в секции «Наука в руках молодых учёных: Антибиотики» (Москва, 2019).

Публикации

По результатам приведённых в настоящей работе исследований опубликовано 6 научных статей, 5 из которых – в журналах, индексируемых Web of Science и Scopus, в том числе 2 статьи в изданиях, входящих в первый квартиль, и 1 статья в издании, входящем во второй квартиль по импакт-фактору согласно рейтингу научных журналов SCImago (SJR, SCImago Journal Rankings); 3 статьи – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ для публикации результатов диссертационных работ:

1. Firsov A. A., Alieva K. N., Strukova E. N., Golikova M. V., Portnoy Y. A., Dovzhenko S. A., Kobrin M. B., Romanov A V., Edelstein M V., Zinner S. H. Testing the mutant selection window hypothesis with *Staphylococcus aureus* exposed to linezolid in an *in vitro* dynamic model // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2017. – Vol. 72. – № 11. – P. 3100-3107.

2. Alieva K. N., Strukova E. N., Golikova M. V., Portnoy Y. A., Zinner S. H., Firsov A. A. Time inside the mutant selection window as a predictor of

staphylococcal resistance to linezolid // The Journal of antibiotics. – 2018. – Vol. 71. – № 5. – P. 514-521.

3. Zinner S. H., Alieva K. N., Strukova E. N., Golikova M. V., Portnoy Y. A., Firsov A. A. Anti-mutant efficacy of antibiotic combinations: *in vitro* model studies with linezolid and daptomycin // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2021.

4. Алиева К. Н., Струкова Е. Н., Голикова М. В., Портной Ю. А., Фирсов А. А. Зависимая от концентрации антибиотика селекция линезолидоустойчивых стафилококков в динамической системе *in vitro* // Антибиотики и химиотерапия. – 2016. – Т. 61. – № 9-10. – С. 28-32.

5. Алиева К. Н., Фирсов А. А. Новое в фармакодинамике противобактериальных средств на 28-м конгрессе ЕССМID // Эффективная фармакотерапия. – 2019. – Т. 15. – № 1. – С. 16-21.

6. Алиева К. Н., Голикова М. В., Портной Ю. А., Фирсов А. А. Комбинированная терапия как путь к предотвращению антибиотикорезистентности бактерий: линезолид—даптомицин против *Staphylococcus aureus* // Антибиотики и химиотерапия. – 2019. – Т. 64. – № 9-10. – С. 8 -13.

Структура и объём работы

Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, двух глав результатов исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы, приложений. Материалы диссертации изложены на 172 страницах, содержат 4 таблицы, 44 рисунка и 6 приложений. Список литературы включает 243 источника, в том числе 231 на иностранном языке.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Проблема устойчивости бактерий к антибиотикам: текущее состояние и пути решения

Снижение чувствительности возбудителей инфекционных заболеваний к старым антибиотикам на фоне замедления темпов создания новых является серьезной проблемой современного здравоохранения (Fair, Tor, 2014; Aslam et al., 2018). Отмеченные тенденции отслеживаются в рамках интернациональных мониторинговых программ. Самыми масштабными из таких программ являются глобальные мультицентровые программы, поддерживаемые ВОЗ, такие как The European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARS-Net, инициирована в 2010 году), Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS, инициирована в 2015 году) и Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR, инициирована в 2015 году). В 2017 году ВОЗ был составлен список из двенадцати возбудителей бактериальных инфекций, резистентные формы которых к отдельным антибиотикам представляют наибольшую угрозу (Таблица 1) (WHO, 2017; Tacconelli et al., 2018). Такие бактерии признаны «приоритетными» как объекты для поиска и разработки новых эффективных препаратов. Под угрозой потери эффективности оказались антибиотики, применяемые в клинической практике для лечения широкого спектра инфекционных заболеваний, вызванных как грамотрицательными, так и грамположительными бактериями, такие как бета-лактамы, ванкомицин, кларитромицин и фторхинолоны.

Антибиотики перечисленных групп, а также аминогликозиды, оказались под угрозой потери эффективности и по результатам еще одной глобальной программы, направленной на мониторинг резистентности патогенных бактерий к антибиотикам, – SENTRY. Эта программа была инициирована еще в 1997 году и действует по настоящее время. SENTRY охватывает более 400

медицинских центров по всему миру (42 страны), а географические зоны наблюдения включают 4 региона: Азиатско-Тихоокеанский, Европейский, включающий Россию, Латино- и Североамериканский. В результате двадцатилетнего наблюдения (с 1997 по 2016 годы) удалось выявить временные и географические тренды развития резистентности бактерий к антибиотикам (Shortridge et al., 2019; Castanheira et al., 2019; Diekema et al., 2019).

Таблица 1. Список бактерий, приоритетных для разработки новых антибиотиков, согласно ВОЗ.

Возбудитель	Резистентность (сниженная чувствительность) к антибиотику или классу антибиотиков
Приоритет 1: Критический	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Карбапенемы
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Карбапенемы
<i>Enterobacteriaceae: Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Enterobacter spp., Serratia spp., Proteus spp., Providencia spp., Morganella spp.</i>	Карбапенемы, цефалоспорины 3-го поколения
Приоритет 2: Высокий	
<i>Enterococcus faecium</i>	Ванкомицин
<i>Staphylococcus aureus</i>	Метициллин, ванкомицин (также промежуточная чувствительность)
<i>Helicobacter pylori</i>	Кларитромицин
<i>Campylobacter</i>	Фторхинолоны
<i>Salmonella spp.</i>	Фторхинолоны
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Цефалоспорины 3-го поколения, фторхинолоны
Приоритет 3: Умеренный	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Пенициллины (нечувствительность)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ампициллин
<i>Shigella spp.</i>	Фторхинолоны

Согласно опубликованным данным, на сегодняшний день особую опасность в связи с возрастающими уровнями распространения представляют следующие штаммы бактерий: энтеробактерии, устойчивые к фторхинолонам

и аминогликозидам, а также продуцирующие карбапенемазы и бета-лактамазы расширенного спектра действия, мультирезистентные формы энтеробактерий (MDR, устойчивые, по крайней мере, к 3 антибиотикам из разных групп); штаммы *P. aeruginosa*, резистентные к нескольким антибиотикам одновременно, а именно, MDR, экстремально резистентные (XDR, устойчивые ко всем группам антибиотиков за исключением 1-2 групп) и панрезистентные (PDR, устойчивые ко всем известным антибиотикам); резистентные к метициллину стафилококки (MRSA), в том числе обладающие устойчивостью к фторхинолонам.

Наряду с масштабными международными программами, описанными выше, широко распространены и активно развиваются национальные мониторинговые программы, направленные на локальное изучение динамики изменения чувствительности бактерий к антибиотикам во времени. В ряде случаев такие программы позволяют более детально отследить тренды роста резистентности патогенных бактерий внутри страны по сравнению с глобальными программами. В России мониторинг резистентности возбудителей внебольничных и нозокомиальных инфекций к антибиотикам проводит Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), при поддержке которой была организована программа RosNet. В рамках программы RosNet, начиная с 1994 года, было запущено более 10 программ, направленных на мониторинг резистентности возбудителей инфекционных заболеваний в различных возрастных группах населения и различной этиологии. На сегодняшний день RosNet охватывает более 30 медицинских центров по всей стране, текущими мониторинговыми проектами являются «ПеГАС», «ДАРМИС» и «МАРАФОН» (URL: <http://www.antibiotic.ru/iacmac/ru/rosnet/>). «ПеГАС» и «ДАРМИС» посвящены изучению чувствительности основных возбудителей инфекций верхних дыхательных путей (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *S. pyogenes*) и внебольничных инфекций мочевыводящих путей, соответственно (Козлов и соавт., 2010; Палагин и соавт., 2012).

В рамках программы «МАРАФОН» проводится долгосрочный (с 2011 года по настоящее время) мониторинг антибиотикорезистентности возбудителей нозокомиальных и внебольничных инфекций различной этиологии (бактерий и грибов) у госпитализированных пациентов (Сухорукова и соавт., 2019; Шек и соавт., 2019; Эйдельштейн и соавт., 2019). Опубликованные результаты данной программы (по состоянию на 2020 г.) показывают тенденцию к снижению эффективности антибактериальных препаратов в отношении ряда нозокомиальных грамотрицательных возбудителей инфекций. Так, среди энтеробактерий, к которым относилась почти половина выделенных возбудителей (большинство принадлежали к виду *K. pneumoniae*), и псевдомонад (*P. aeruginosa*) часто встречалась устойчивость к оксимино-бета-лактамам (цефотаксиму, цефтазидиму, цефепиму и азтреонаму) – 67,2% и выше в зависимости от препарата), у 67,8% изолятов выявили продукцию бета-лактамаз расширенного спектра действия. Отмечен рост резистентности энтеробактерий к карбапенемам и увеличение частоты обнаружения изолятов – продуцентов карбапенемаз в период 2015-2016 гг. по сравнению с 2013-2014 гг.

Выявленные тенденции распространения энтеробактерий и псевдомонад, продуцирующих карбапенемазы, а также бета-лактамазы расширенного спектра действия, действующие на цефалоспорины 3 поколения, согласуются с общемировыми тенденциями развития резистентности.

Как показывают мониторинговые исследования, со временем резистентность развивается к любому антибиотику, и предотвратить это пока не удаётся. С целью своевременного отслеживания изменений в чувствительности бактерий-мишеней к новым антибиотикам начало их применения за рубежом обычно сопровождается запуском программы по мониторингу развития устойчивости. Примерами таких программ являются ZAAPS и LEADER (линезолид), T.E.S.T. (тигециклин) и MYSTIC (меропенем).

По результатам мониторинга резистентности бактерий к линезолиду, первому представителю группы синтетических антибиотиков оксазолидинонов, чувствительность бактерий к нему сохраняется на высоком уровне (Pfaller et al., 2017; Mendes et al., 2018; Diekema et al., 2019). Вместе с тем, сообщения о выделении резистентных штаммов стафилококков и энтерококков начали появляться вскоре после введения линезолида в клиническую практику (Tsiodras et al., 2001; Johnson et al., 2002; Auckland et al., 2002). То же справедливо и для даптомицина, антибиотика из группы липопептидов (Vikram et al., 2005; Lewis II et al., 2005; Munoz-Price et al., 2005). Эти и последующие сообщения о выделении устойчивых к линезолиду и даптомицину штаммов *S. aureus* и других грамположительных бактерий могут предвещать дальнейшее возрастание резистентности к данным препаратам (данные сообщения рассмотрены в Разделе 1.5). Такие «перспективы» указывают на повышение рисков распространения резистентных бактерий к новым препаратам и, как следствие, снижения их эффективности.

Описанная проблема распространения бактерий, резистентных к давно вошедшим в клиническую практику антибиотикам, обуславливает важность использования грамотного и оправданного подхода к применению антибактериальных средств для лечения инфекционных заболеваний. К сожалению, понимание необходимости исследования возможностей оптимизации антибиотикотерапии пришло лишь тогда, когда распространение резистентных форм бактерий стало приобретать угрожающие масштабы. В 2015 году разработки в области рационализации антибиотикотерапии, которые включают оптимизацию схем применения антибиотиков, как новых, так и давно используемых в клинической практике, были признаны одним из основных способов борьбы с антибиотикорезистентностью (WHO, 2015).

Комплекс необходимых для стационаров мероприятий по рационализации использования антимикробных препаратов, сдерживанию антибиотикорезистентности, контролю нозокомиальных инфекций за рубежом обозначается как «Управление антибиотикотерапией» (Antibiotic

Stewardship), а в России как «Стратегия Контроля Антимикробной Терапии (СКАТ) (Яковлев и соавт., 2017; СКАТ, 2018). Программа СКАТ действует в России с 2011 г., в ней участвует более 60 стационаров из разных регионов страны. В соответствии с данной программой были составлены Методические рекомендации для лечебно-профилактических учреждений Москвы (Яковлев и соавт., 2017).

Оптимизация схем применения уже известных антибиотиков необходима в связи с резким сокращением притока принципиально новых эффективных препаратов. За последние 20 лет было разработано и внедрено в клинику лишь три антибиотика новых классов, одобренных для системного применения при инфекциях, вызванных такими бактериями как золотистый стафилококк и энтерококки: оксазолидиноны (линезолид, тедизолид) и липопептид – даптомицин. По данным некоторых локальных мониторинговых программ в ряде стран уже отмечается возрастание объёмов потребления даптомицина, что при нерациональном применении данного препарата вполне может привести к резкому снижению его эффективности (Meyer et al., 2011; Egli et al., 2017; European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU/EEA, annual epidemiological report for 2018, 2019).

Наряду с оптимизацией схем применения уже существующих антибактериальных препаратов и разработкой новых, важным способом борьбы с антибиотикорезистентностью бактерий является применение комбинированной антибиотикотерапии (Fair, Tor, 2014; Aslam et al., 2018). Для разработки стратегии составления оптимальных схем комбинированной антибиотикотерапии необходимо обосновать методологию прогнозирования риска развития антибиотикорезистентности бактерий и возможности ее предотвращения на фоне применения нескольких антибактериальных препаратов.

1.2 Динамическая система *in vitro*

Фармакокинетико-фармакодинамическое моделирование является одним из основных методологических подходов к оптимизации антибиотикотерапии. Его инструмент – динамические системы *in vitro*. Такие системы позволяют исследовать процессы развития антибиотикорезистентности микроорганизмов при фармакокинетически обусловленных изменениях концентрации антибиотика, реализующихся *in vivo*, при том или ином способе введения, дозе, интервале дозирования. Более того, они дают возможность оценивать эффект антибиотика в отношении резистентных мутантов («антимутантный» эффект) в зависимости от локализации инфекционного процесса, сравнивать «антимутантный» эффект разных антибиотиков при их применении в дозах, соответствующих терапевтическим, в том числе в условиях их комбинированного применения (O'Grady, Pennington, 1966; Blaser et al., 1985b; White, 2001).

Направление фармакокинетико-фармакодинамических исследований в динамических системах *in vitro* начало развиваться с 1980-х годов, когда были опубликованы первые работы с описанием конструкции динамической системы *in vitro* и принципа её действия (Grasso, 1985; Blaser et al., 1985a, 1985b). Динамическая система *in vitro* представляет из себя систему соединённых между собой сосудов. Основной сосуд, центральная камера, содержит жидкую питательную среду с бактериями и антибиотиком, концентрация которого постоянно изменяется. Изменение концентрации антибиотика реализуется посредством контролируемого разбавления раствора антибиотика в центральной камере системы при сохранении в ней объёма питательной среды на постоянном уровне.

После введения в практику проведения научных исследований с применением динамических систем, группами США, Великобритании, Бельгии, Канады и России были осуществлены многочисленные фармакокинетико-фармакодинамические исследования с антибиотиками

разных групп и бактериями разных видов, как грамположительными, так и грамотрицательными. Было изучено влияние различных факторов на антимикробный эффект антибиотика путем варьирования исходных условий в эксперименте: формы реализуемого фармакокинетического профиля, режимов дозирования препарата, скорости его элиминации, применения комбинации антибиотиков. Кроме того, величину антимикробного эффекта антибиотика возможно изучать при разных уровнях исходной микробной нагрузки. Опыт применения динамических систем для изучения фармакодинамических свойств антибиотиков достаточно велик, возможности применения методов фармакокинетико-фармакодинамического моделирования для изучения фармакодинамики антибиотиков обобщены в обзорных работах (Bergan, 1986; Murakawa, 1993; Rybak et al., 2001; Firsov et al., 2018).

1.2.1 Воспроизведение моноэкспоненциального фармакокинетического профиля антибиотика в динамической системе *in vitro*

Для описания фармакокинетики препаратов обычно используют линейную одночастевую модель (Соловьёв и соавт., 1980). Организм представляется в виде условной камеры: лекарственное вещество мгновенно поступает в неё, равномерно распределяясь по всему объёму, и затем постепенно выводится согласно законам кинетики первого порядка. Элиминация антибиотика из системы описывается уравнением моноэкспоненты.

Вышеописанный принцип лежит в основе простейшего случая моделирования фармакокинетики антибиотика в динамической системе *in vitro*: воспроизводится элиминация вещества из системного кровотока после его одномоментного внутривенного введения. Моноэкспоненциальное снижение концентрации антибиотика достигается путём контролируемого разбавления жидкости в проточной камере, содержащей вводимый

антибиотик и бактериальные клетки. Приток в камеру чистого растворителя и отток из неё разбавляемого раствора происходит с одинаковой объёмной скоростью F (flow rate), что обеспечивает постоянство объёма её содержимого (Рисунок 1) (Фирсов и соавт., 1989; Firsov et al., 2007).

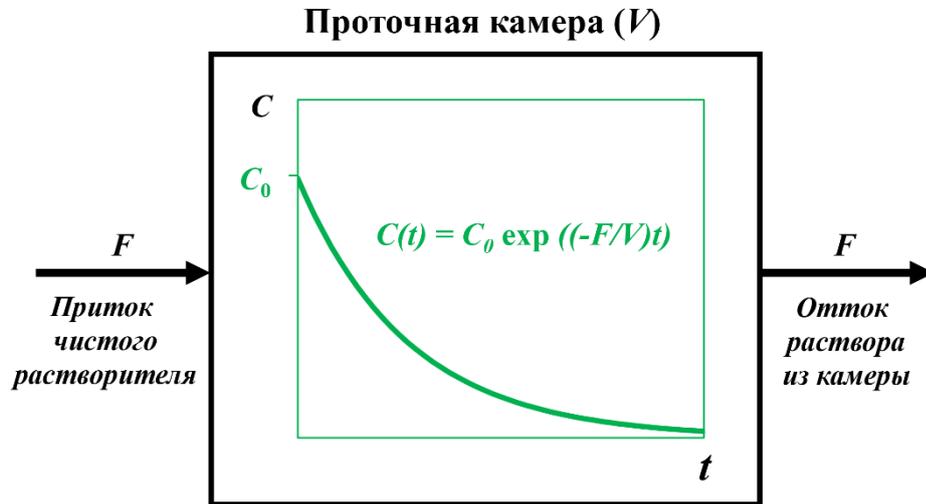


Рисунок 1. Принцип воспроизведения моноэкспоненциального снижения концентрации препарата в динамической системе.

В этих условиях скорость изменения количества препарата во времени прямо пропорциональна его концентрации (кинетика первого порядка):

$$dA/dt = -FC, \quad (1)$$

где A – количество антибиотика, t – время, F – объёмная скорость, C – концентрация антибиотика.

Соответствующее изменение концентрации препарата описывается уравнением

$$dC/dt = -FC/V, \quad (2)$$

где V – объём раствора в камере.

Интегрирование уравнения (2) при начальном условии $C(0) = C_0$ позволяет найти аналитический вид зависимости концентрации антибиотика в камере от времени

$$C(t) = C_0 \exp((-F/V)t) \quad (3)$$

Данное уравнение аналогично уравнению, описывающему фармакокинетику препаратов *in vivo*:

$$C(t) = C_0 \exp((-Cl/V_d)t) \quad (4)$$

где Cl – общий клиренс, и V_d – кажущийся объём распределения.

В системе объёмная скорость выполняет роль общего клиренса, а объём раствора в камере – кажущегося объёма распределения. Соответствие параметров системы фармакокинетическим параметрам позволяет преобразовать взаимосвязь между периодом полувыведения, кажущимся объёмом распределения и общим клиренсом

$$T_{1/2} = \ln 2 V_d/Cl \quad (5)$$

$$T_{1/2} = \ln 2 V/F. \quad (6)$$

Полученная взаимосвязь позволяет вычислить объёмную скорость при известном объёме раствора в камере и периоде полувыведения антибиотика:

$$F = \ln 2 V/T_{1/2}. \quad (7)$$

За величину $T_{1/2}$ исследуемого антибиотика принимают значение, установленное в результате изучения его фармакокинетики у человека. Наиболее часто используется период полувыведения, характерный для здорового человека, но, в зависимости от цели исследования, могут быть воспроизведены значения периода полувыведения при изменениях нормальных значений клиренса, например, вызванных почечной недостаточностью.

Терапия инфекционных заболеваний предполагает многократное введение антибактериальных препаратов (исключение – антибиотики со сверхдолгой элиминацией). Динамические системы позволяют моделировать профили антибиотиков при их многократном введении, причём профиль может соответствовать клинически реализуемому или отвечать любым другим задачам эксперимента. В случае многократного введения уровни концентрации препарата постепенно нарастают до достижения равновесного состояния (steady-state) (Рисунок 2). Данное обстоятельство учитывается при расчёте таких фармакокинетических параметров, как $C_{\text{МАКС}}$ (максимальная концентрация антибиотика) и ПФК (площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время», определяемая в пределах 24 ч).

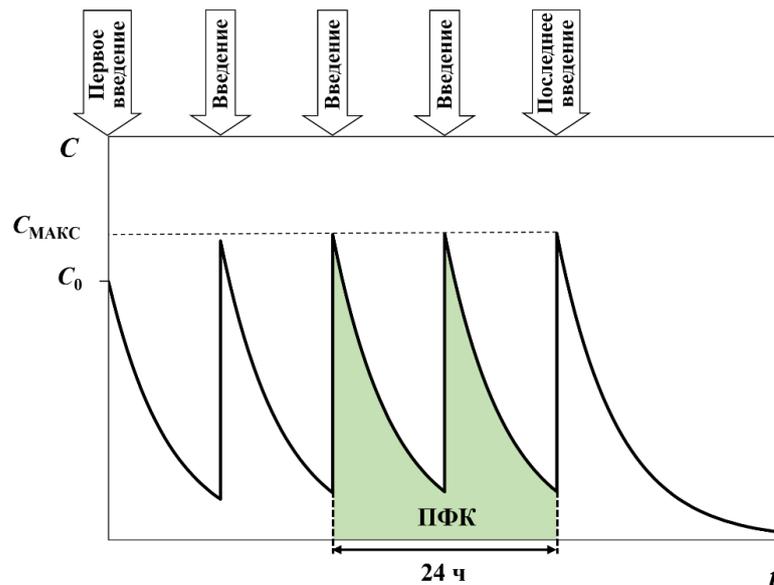


Рисунок 2. Типичный профиль антибиотика с моноэкспоненциальным снижением концентрации при многократном струйном введении препарата.

1.2.2 Одновременное воспроизведение фармакокинетических профилей двух антибиотиков с различными периодами полувыведения

При исследовании фармакодинамики антибиотиков в комбинации возникает задача одновременного моделирования нескольких фармакокинетических профилей. Если периоды полувыведения препаратов не совпадают, корректной элиминации обоих невозможно добиться при одной объёмной скорости в системе. В таком случае система модифицируется путём усложнения конструкции, а объёмные скорости потоков регулируются по принципу суперпозиции (Blaser, 1985). Если моделируются фармакокинетические профили двух антибиотиков, характеризующихся разными периодами полувыведения, то устанавливается дополнительная проточная камера, соединённая с источником свежей среды и основной камерой (Рисунок 3).

В начальный момент времени в основную камеру динамической системы добавляется антибиотик с бóльшей (1) и с меньшей (2) скоростью элиминации в количестве, обеспечивающем заданное значение начальной

концентрации – C_{01} и C_{02} , соответственно. В дополнительной камере со свежей средой задаётся такая же концентрация препарата 2, как в основной камере.

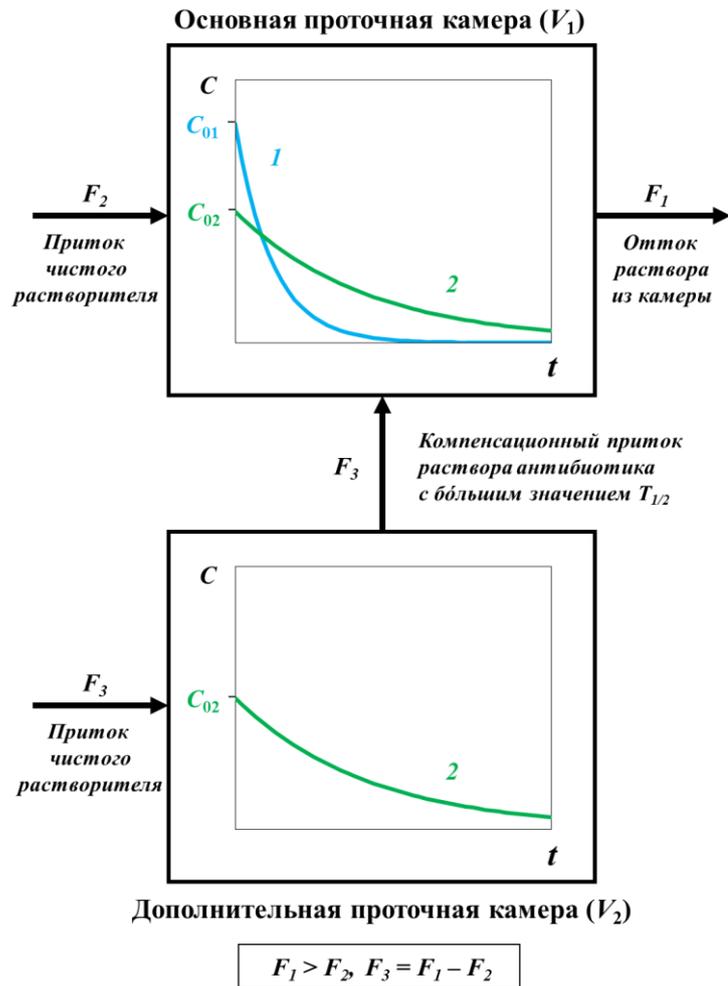


Рисунок 3. Принцип воспроизведения моноэкспоненциального снижения концентрации двух препаратов при их одновременном присутствии в динамической системе.

Для воспроизведения необходимой скорости элиминации антибиотика 1 должно выполняться условие

$$dC_1/dt = -F_1C_1/V_1, \quad (8)$$

где F_1 – объёмная скорость, рассчитанная согласно уравнению (7) на основании значения $T_{1/2}$ антибиотика 1, C_1 – концентрация антибиотика 1, V_1 – объём раствора в основной камере.

Чтобы в этих условиях компенсировать чрезмерно быструю элиминацию антибиотика 2, его раствор непрерывно подаётся из дополнительной камеры в основную. Объёмная скорость компенсационного

притока вычисляется на основании уравнения, описывающего изменение концентрации антибиотика 2 в основной камере

$$dC_2/dt = -F_2 C_2 / V_1, \quad (9)$$

где F_2 – объёмная скорость, рассчитанная согласно уравнению (7) на основании значения $T_{1/2}$ антибиотика 2, C_2 – концентрация антибиотика 2, V_1 – объём раствора в основной камере.

Данное уравнение можно преобразовать в

$$dC_2/dt = (S_2 - F_1 C_2) / V_1, \quad (10)$$

где $S_2(t)$ – переменная скорость добавления препарата 2 в основную камеру:

$$S_2(t) = C_2(t) (F_1 - F_2). \quad (11)$$

Отсюда следует, что восполнение концентрации антибиотика 2 в основной камере достигается при притоке его раствора такой же переменной концентрации из дополнительной камеры с объёмной скоростью F_3 :

$$F_3 = F_1 - F_2. \quad (12)$$

С целью сохранения объёма раствора антибиотика 2 чистый растворитель поступает в дополнительную камеру с такой же объёмной скоростью. Постоянство объёма жидкости в основной камере достигается при помощи подачи в неё растворителя со скоростью F_2 , равной разнице объёмных скоростей удаления раствора из основной камеры и притока в неё содержимого дополнительной камеры: $F_2 = F_1 - F_3$.

При условии одинаковой переменной концентрации антибиотика 2 (dC_2/dt) в основной и дополнительной камере:

$$(F_2 - F_1) C_2 / V_2 = (F_1 - F_2 - F_1) C_2 / V_1. \quad (13)$$

где V_2 – объём раствора в дополнительной камере, который можно вычислить как:

$$V_2 = (F_1 - F_2) V_1 / F_2. \quad (14)$$

1.2.3 Возможности и ограничения исследований в динамической системе *in vitro*

Использование динамических систем *in vitro* в качестве инструмента при изучении фармакодинамики антибиотиков позволяет преодолеть ряд трудностей технического и этического характера, присущих методам *in vivo*. Например, при проведении комплексных фармакокинетико-фармакодинамических исследований в клинике не всегда удаётся идентифицировать возбудителя инфекции и проследить возможные изменения его чувствительности к антибиотику в процессе терапии. Контроль концентрации антибиотика у каждого пациента в условиях клиники не может быть обеспечен. Ряд факторов может помешать объективной оценке клинической эффективности препарата, а в случае комбинации антибиотиков не представляется возможным оценить их эффективность по отдельности. Поскольку цель терапии в клинике – излечение пациентов, нельзя использовать неодобренные или экстремальные режимы дозирования антибиотиков, применение которых могло бы потребоваться для определения функционального вида искомых зависимостей.

Большую часть ограничений при проведении исследований с участием пациентов можно преодолеть в исследованиях на животных. Животные модели обеспечивают условия роста бактерий, близкие к таковым у человека, но различия в метаболизме создают проблему межвидовой экстраполяции данных.

При проведении исследований *in vitro* макроорганизмы не задействованы вовсе, что позволяет достичь высокого уровня стандартизации условий и исключить этические проблемы. Как было отмечено ранее, применение динамических систем позволяет изучать антимикробный и «антимутантный» эффект антибиотика при фармакокинетически обусловленных изменениях его концентрации. Создаваемые условия значительно ближе к условиям человеческого организма по сравнению с

такowymi в исследованиях *in vitro* в статике, то есть при неизменной концентрации антибиотика. Помимо принципиального учёта фармакокинетики препаратов, использование динамических систем также открывает возможность проведения длительных экспериментов (более 48 ч), так как благодаря постоянному обновлению питательной среды в системе поддерживается нормальная жизнедеятельность бактерий. Обеспечение достаточной плотности инокулята бактерий и времени их экспозиции в динамической системе позволяет изучать процессы развития устойчивости практически к любому из антибиотиков. Высокая исходная численность бактериальных клеток (10^8 КОЕ/мл), как правило, гарантирует присутствие резистентных клеток в количестве, позволяющем отследить их селекцию (Zhao, Drlica, 2001). Необходимость длительного воздействия антибиотика на бактерии обусловлена тем обстоятельством, что потеря чувствительности возбудителей инфекций к ряду препаратов в клинике наступает после продолжительной терапии.

Следует отметить, что при проведении исследований с использованием динамических систем *in vitro* не учитываются особые условия в организме человека, а также его реакции на введение лекарственного препарата и присутствие возбудителя болезни. Это препятствует непосредственному использованию результатов, полученных в динамических системах, в клинике. К таким реакциям организма относятся обратимое связывание молекул препарата с белками плазмы крови и иммунный ответ макроорганизма на бактерии-возбудители инфекции. Распространенный подход к учёту белкового связывания за счет формального пересчета общей концентрации антибиотика на концентрацию не связанного с белками препарата может привести к переоценке роли связывания и недооценке реальной антимикробной активности препарата. Это неоднократно подтверждалось исследованиями по изучению эффекта антибиотиков в модельных опытах с альбумином (Odenholt et al., 2007; Schmidt et al., 2008). По их результатам реальные эффективные концентрации препарата (телаванцина,

даптомицина, цефтриаксона) оказались гораздо выше концентраций, рассчитанных исходя из степени его связывания. Результаты подобных исследований с даптомицином неоднозначны. В одном исследовании в динамической системе эффект липопептида в отношении стафилококков и энтерококков был выше при моделировании рассчитанных «свободных» концентраций препарата, чем при моделировании терапевтически реализуемых концентраций и добавлении альбумина (Cha, Rybak, 2004). Авторы другого исследования с парой даптомицин – *S. aureus*, проведённого в статических условиях, получили противоположный результат (Lamp, Rybak, 1993). Была отмечена более высокая, по сравнению с ожидаемой, активность ряда препаратов (даптомицина, телаванцина, тейкопланина и ванкомицина) в присутствии как альбумина, так и сыворотки крови животного или человека (Tsuji et al., 2008). Отмеченная неопределённость пока не позволяет корректно учитывать фактор белкового связывания при проведении исследований в динамических системах *in vitro*.

Как было сказано выше, вклад иммунного ответа также не может быть учтён при изучении эффекта антибиотиков в условиях *in vitro*. Вместе с тем, есть ряд примеров, когда прогнозируемый в динамической системе *in vitro* эффект антибиотиков при их применении в соответствующих терапевтических дозах (фторхинолонов, линезолида, даптомицина), согласовывался с результатами исследований эффективности этих препаратов в клинике (Graham et al., 1997; Niederman et al., 1997; Sullivan et al., 1997; Firsov et al., 1998; Perry et al., 1999; Rayner et al., 2003; Zhang et al., 2006; Seaton et al., 2015). Примеры таких работ будут более подробно рассмотрены ниже, в Разделе 1.3.

1.3 Фармакокинетико-фармакодинамические исследования в динамических системах *in vitro* при моделировании режимов монотерапии

1.3.1 Зависимость между антимикробным эффектом и концентрацией антибиотика, прогнозирование эффективности антибиотиков в клинике

Среди исследований, посвящённых изучению антимикробного эффекта антибиотиков при моделировании клинических режимов их применения, можно выделить ряд работ, целью которых стал поиск количественных соотношений между концентрацией антибиотика и его эффектом, в общем виде – зависимости «эффект – концентрация» (Klepser et al., 2001; Firsov et al., 2003, 2006, 2013; Strukova et al., 2009, 2016a, 2016b).

При установлении таких зависимостей фармакокинетические профили антибиотиков характеризуются значениями площади под кривой изменения концентрации антибиотика во времени (ПФК), отнесённой к МПК данного антибиотика в отношении микроорганизма-мишени, – ПФК/МПК. Варьирование значений ПФК/МПК в широком диапазоне, включающем значения ПФК, соответствующие как терапевтическим, так и субтерапевтическим, позволяет определить вид зависимости «эффект – концентрация»: она имеет однонаправленный характер, поскольку повышение дозы антибиотика приводит к возрастанию его антимикробного эффекта, и описывается сигмоидной функцией. На сегодняшний день такие функциональные зависимости между эффектом и значениями ПФК/МПК установлены в работах с фторхинолонами, липо- и гликопептидами, линезолидом (Firsov et al., 1997, 2000a, 2001, 2002a, 2002b, 2006; MacGowan et al., 2000, 2001; Klepser et al., 2001; Strukova et al., 2009).

По результатам исследований были разработаны методы количественной оценки антимикробного эффекта антибиотиков с целью установления зависимости «эффект – концентрация» и прогнозирования

эффективности антибиотиков при терапевтически реализуемых значениях их концентрации. Было показано, что для этих целей наиболее применимы интегральные параметры антимикробного эффекта (Рисунок 4): ППК (площадь под кинетической кривой изменения численности бактериальных клеток, ограниченная временем (τ) и пределом их количественного определения (на Рисунке 4 – ось абсцисс)), ПМК (площадь между кинетической кривой изменения численности бактериальных клеток без антибиотика и в его присутствии, ограниченная τ) и I_E (параметр ПМК, определяемый до того момента, когда численность клеток бактерии в фазе вторичного роста равна таковой на контрольной кривой) (Firsov et al. 2006; Strukova et al., 2009).

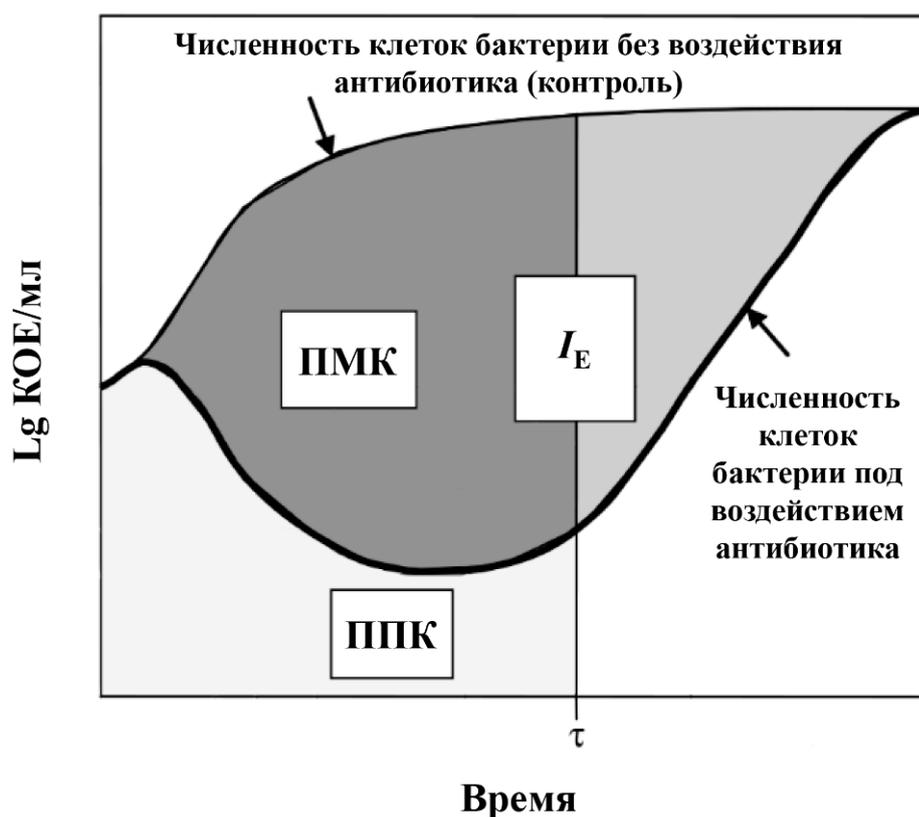


Рисунок 4. Интегральные параметры антибактериального эффекта. По Firsov et al., 1997.

Пример такой зависимости « I_E – ПФК/МПК», полученной для линезолида, и использованной для прогнозирования его клинической эффективности, показан на рисунке 5.

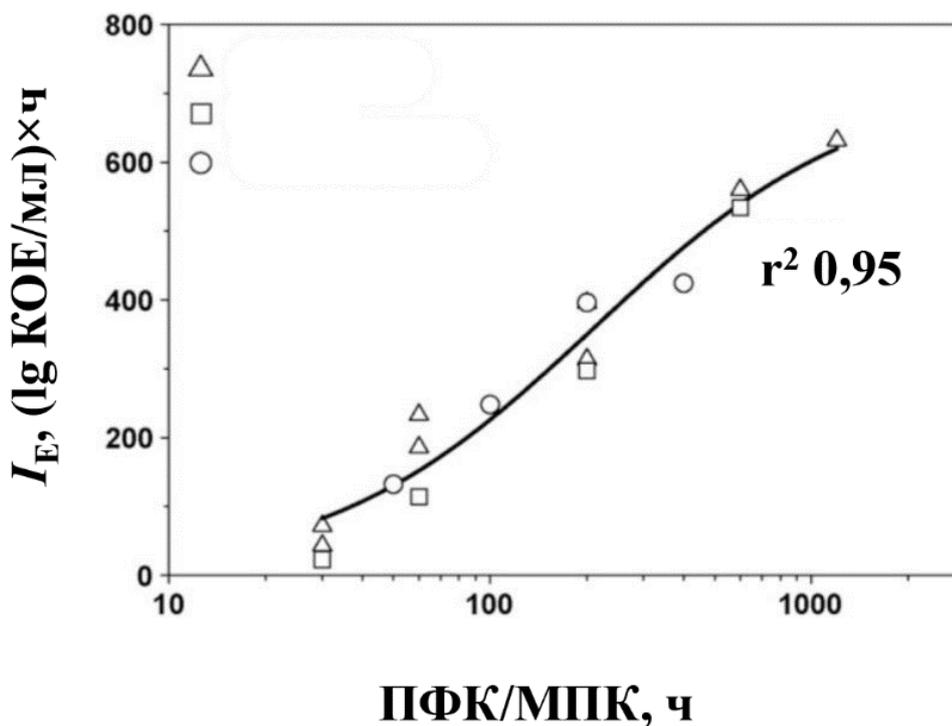


Рисунок 5. Зависимость антистафилококкового эффекта линезолида, выраженного параметром I_E , от значений ПФК/МПК антибиотика. Объединённые данные по 3 штаммам *S. aureus*. По Strukova et al., 2009.

Достоверность заключений об эффективности антибиотиков при терапевтически реализуемых значениях их концентрации, сделанных на основании результатов экспериментов в динамических системах *in vitro*, была подтверждена по результатам исследований *in vivo*. Примеры такого анализа зависимости «эффект – концентрация», а также сопоставления прогнозов эффективности антибиотиков на основании экспериментальных данных с их клинической эффективностью представлены в работах с фторхинолонами, липо- и гликопептидами, линезолидом (Madaras-Kelly et al., 1996b; Forrest et al., 1997; Graham et al., 1997; Niederman et al., 1997; Sullivan et al., 1997; Firsov et al., 1998, 1999, 2000a, 2000b, 2000c, 2001, 2005; Wiedemann, 1998; Lacy et al., 1999; Lister, Sanders, 1999a, 1999b; Perry et al., 1999; Vostrov et al., 2000; Schentag et al., 2003; Zinner et al., 2004; Zhang et al., 2006; Lubenko et al., 2008).

Так, предсказанные эффективные значения ПФК/МПК левофлоксацина и грепафлоксацина при лечении стафилококковых инфекций, равные 115 и 78

ч, соответственно, оказались близкими терапевтическим – 100 и 75 ч, соответственно (Forrest et al., 1997; Schentag et al., 2003; Firsov et al., 2005). Помимо эффективных значений ПФК/МПК, также были спрогнозированы значения эффективных суточных доз тровафлоксацина и гатифлоксацина, 210 и 350 мг, соответственно, при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, оказались близкими к рекомендованным клиническим дозам этих антибиотиков – 200 и 400 мг, соответственно (Graham et al., 1997; Niederman et al., 1997; Sullivan et al., 1997; Firsov et al., 1998; Perry et al., 1999; Zhang et al., 2006).

По данным, представленным в работах с антибиотиками других групп, такими как даптомицин и линезолид, также было показано соответствие их эффективности, прогнозируемой в экспериментах в динамической системе и установленной в клинике. Так, выраженный антистафилококковый эффект линезолида, установленный в динамической системе *in vitro* при значении ПФК/МПК, равном терапевтическому (100 ч), согласовывался с результатами клинических исследований, где значение ПФК/МПК, равное 100 ч, было пороговым, то есть при значениях ПФК/МПК >100 ч вероятность достижения полного бактериологического излечения инфекций, вызванных *S. aureus*, составляла 100% (Rayner et al., 2003). В случае даптомицина отмечали выраженный антистафилококковый эффект антибиотика при моделировании клинического режима его дозирования (6 мг/кг каждые 24 ч) в динамической системе *in vitro* (LaPlante, Rybak, 2004; Rose et al., 2008), что согласовывалось с клиническими данными о высокой эффективности липопептида при его назначении в той же дозе (Seaton et al., 2015). Показанная на этих примерах применимость динамических систем *in vitro* для прогнозирования клинической эффективности антибиотиков свидетельствует об их широких возможностях в областях доклинического и клинического изучения фармакодинамики антимикробных препаратов.

1.3.2 Изучение процессов развития резистентности бактерий к антибиотикам, применимость гипотезы окна селекции мутантов (ОСМ)

Наряду с изучением действия антибиотиков на общую популяцию бактерий, динамические системы *in vitro* также позволяют изучать воздействие антибиотиков и на резистентные субпопуляции бактерий. Фармакокинетико-фармакодинамические исследования с применением динамических систем, направленные на изучение процессов развития антибиотикорезистентности бактерий, начали активно развиваться с 2000-х годов. До этого времени такие исследования были немногочисленны, и их авторы акцентировали своё внимание на изучении эффекта антибиотиков в отношении резистентных мутантов («антимутантного» эффекта) только при режимах дозирования, соответствующих терапевтическим. Выводы, основанные на результатах этих исследований, имели скорее качественный характер, поскольку позволяли ответить на вопрос, наблюдается или нет развитие резистентности при том или ином режиме дозирования антибиотика (Blaser et al., 1987; Marchbanks et al., 1993; Madaras-Kelly et al., 1996a; Aeschlimann et al., 1999; Lacy et al., 1999; Peterson et al., 1999; Zhanel et al., 2001; Wright et al., 2002; Coyle et al., 2001; Thorburn, Edwards, 2001; Madaras-Kelly, Demasters, 2000).

Начиная с 2000-х годов, стали появляться исследования, в которых авторы варьировали дозы антибиотиков (выражая их через значения ПФК) в широком диапазоне (включая значения, соответствующие субтерапевтическим и/или супертерапевтическим) и пытались установить количественные соотношения между резистентностью и ПФК/МПК. Эти исследования проводились с фторхинолонами и *Streptococcus pneumoniae* (Klepser et al., 2001; MacGowan et al., 2003), *Bacterioides fragilis* (Peterson et al., 2002), *Bacteroides thetaiotamicron* (Ross et al., 2001) и *Pseudomonas aeruginosa* (Madaras-Kelly et al., 1996a; MacGowan et al., 2003). Эти попытки оказались безуспешными, поскольку установить корреляцию между ростом

резистентности и ПФК/МПК антибиотика не удавалось. Например, работа Klepser M. E. с соавторами (2001) была посвящена сравнительному изучению «антимутантного» эффекта шести фторхинолонов в отношении трёх штаммов *S. pneumoniae* при моделировании как терапевтических значений ПФК, так и значений в 10 раз больших или меньших (100-кратные различия между минимальными и максимальными значениями ПФК) (Klepser et al., 2001). Несмотря на варьирование моделируемых значений ПФК (или ПФК/МПК) антибиотиков в широком диапазоне, зависимость между резистентностью пневмококков к фторхинолонам и ПФК/МПК выявить не удалось. Действительно, при построении зависимости между изменением чувствительности пневмококков к антибиотику и его ПФК/МПК, выраженной как отношение МПК антибиотика в конце опыта, $МПК_{\text{ФИН}}$, к его исходному значению, $МПК_{\text{ИСХ}}$, – $МПК_{\text{ФИН}}/МПК_{\text{ИСХ}}$, точки на графике зависимости « $МПК_{\text{ФИН}}/МПК_{\text{ИСХ}}$ – ПФК/МПК» располагались хаотично (Рисунок 6).

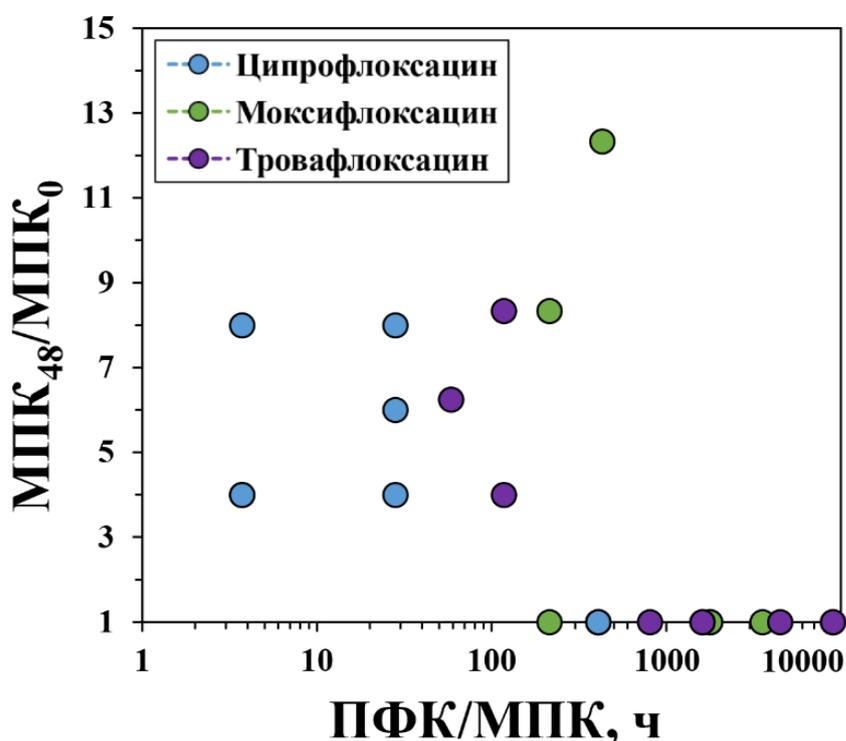


Рисунок 6. Зависимость снижения чувствительности *S. pneumoniae* к фторхинолонам, выраженная отношением $МПК_{\text{ФИН}}/МПК_{\text{ИСХ}}$, от ПФК/МПК. По данным Klepser et al., 2001 (реконструированные данные, объединённые по всем штаммам *S. pneumoniae* для каждого из препаратов).

Лишь в одной из упомянутых выше работ авторы попытались описать сигмоидной функцией зависимость между снижением чувствительности *Pseudomonas aeruginosa* к ципрофлоксацину или офлоксацину в конце эксперимента и моделируемым значением ПФК/МПК антибиотика (Madaras-Kelly et al., 1996b). Madaras-Kelly К. J. с коллегами действовали по аналогии, используя ту же сигмоидную функцию, которая была применена ими и для описания зависимости антимикробного эффекта фторхинолонов в отношении общей популяции псевдомонад от значения ПФК/МПК. В отличие от зависимости «эффект – ПФК/МПК», для которой коэффициент корреляции составил 0,70, зависимость «резистентность – ПФК/МПК» была описана с намного более низким коэффициентом корреляции 0,40, а точки на графике располагались хаотично. В последнем случае целесообразность описания данных при помощи сигмоидной функции вызывает большие сомнения.

Так в чём же причина описанных неудач при попытках найти корреляцию между развитием резистентности бактерий и концентрацией воздействующего на них антибиотика? В одной из рассмотренных работ для описания зависимости «резистентность – ПФК/МПК» авторы «по умолчанию» применяли сигмоидную функцию (Madaras-Kelly et al., 1996b). Это было продиктовано вполне логичным, как казалось на тот момент, ожиданием авторов увидеть однонаправленную зависимость – чем выше моделируемое значение ПФК/МПК антибиотика, тем менее выражено развитие резистентности. Такую же, как в случае с действием антибиотиков на общую популяцию бактерий, когда антимикробный эффект антибиотика неизменно возрастал при повышении концентрации препарата. Реально же в этой и в других упомянутых работах повышение концентрации антибиотика в системе (или ПФК/МПК) приводило к обратному эффекту – возрастанию резистентности патогенных микроорганизмов, и лишь при моделировании режимов дозирования с близкими к максимальным или с максимальными значениями ПФК/МПК, зачастую превышающими значения, реализуемые терапевтически, резистентности не наблюдалось.

Объяснить отсутствие однонаправленной связи между резистентностью и концентрацией антибиотика стало возможным благодаря исследованиям ученых из Испании (Baquero, 1990) и США (Zhao, Drlica, 2001), которые предсказали существование гораздо более сложной, куполообразной формы зависимости «резистентность – концентрация». Исследования проводились с фторхинолонами и бактериями разных видов в 1990-е (Испания) и в начале 2000-х гг. (США). Авторы работ предположили, что существует такой диапазон концентраций антибиотика, в пределах которого вероятность селекции устойчивых мутантов значительно возрастает. Этот диапазон концентраций был назван «опасным окном» (ОО, «dangerous window») (Baquero, 1990) или «окном селекции мутантов», (ОСМ, «mutant selection window») (Zhao, Drlica, 2001). В общем виде суть этих предположений основывается на следующем. Клетки со сниженной чувствительностью к антибиотику всегда присутствуют в бактериальной популяции, возникая в результате случайных мутаций. Вместе с тем, их доля в популяции ничтожно мала: 1 устойчивая клетка на $10^6 - 10^{11}$ чувствительных, в зависимости от антибиотика и бактерии (Evans, Titlow, 1998; Drugeon et al., 1999; O'Neill et al., 2001; Silverman et al., 2001; Drago et al., 2005, 2008; Miller et al., 2008; Clark et al., 2009; Locke et al., 2009b). Чтобы мутантные клетки имели возможность к пролиферации, необходимо воздействие селективного фактора, способствующего элиминации чувствительных клеток из популяции и, таким образом, созданию условий для размножения мутантных клеток. В роли такого селективного фактора при проведении антибиотикотерапии выступает сам антибиотик. Когда концентрация антибиотика оказывается достаточной для подавления роста чувствительных к нему клеток в популяции, то есть превышает МПК, но не способна предотвратить рост устойчивых мутантов – создаются условия для их пролиферации. Этот диапазон концентраций антибиотика, снизу ограниченный значением его МПК в отношении чувствительных клеток популяции, а сверху – значением МПК антибиотика в отношении устойчивых мутантов (МПК_М), и был назван «опасным окном» или

«окном селекции мутантов». Рост устойчивых клеток в популяции наиболее вероятен, когда концентрация антибиотика находится в пределах такого «окна» и наименее вероятен, когда концентрация антибиотика находится за его пределами. Наглядно такая связь между концентрацией антибиотика и долей устойчивых мутантов в популяции была продемонстрирована в одной из работ Вакуро и соавт. с цефотаксимом и *Escherichia coli* (статические эксперименты) (Рисунок 7) (Вакуро, Negri, 1997). Как видно на рисунке, при повышении концентрации цефотаксима в питательной среде, изменение доли устойчивых клеток в % от общей популяции *E. coli* происходило волнообразно, сначала возрастая, а затем снижаясь.

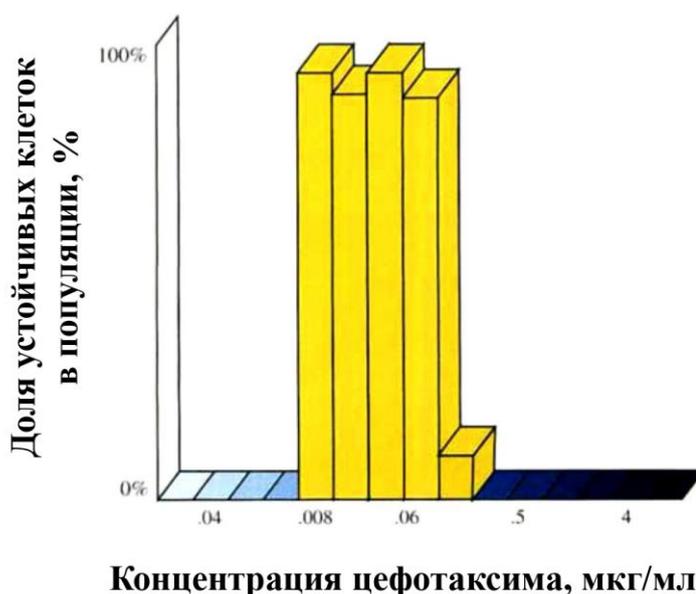


Рисунок 7. Зависимость доли устойчивых мутантов в популяции *E. coli* от концентрации цефотаксима. По Вакуро, Negri, 1997.

Исследования с фторхинолонами и бета-лактамами, по результатам которых была выдвинута гипотеза о существовании ОО или ОСМ и предсказан нелинейный характер зависимости между резистентностью бактерий и концентрацией антибиотика, были проведены в условиях *in vitro* при постоянных концентрациях антибиотика. Вопрос о применимости установленных закономерностей в условиях, когда концентрация антибиотика постоянно изменяется в соответствии с тем, как это происходит в живом

организме, оставался открытым. Важную роль в изучении этого вопроса сыграли динамические системы *in vitro*.

Одними из первых, кому удалось подтвердить нелинейный, куполообразный вид зависимости между развитием резистентности бактерий и ПФК/МПК антибиотика с использованием динамических систем, стали исследователи из России. Эти работы начали проводиться вскоре после того, как в 2001 году была опубликована статья Zhao X. и Drlica K. (Zhao, Drlica, 2001), посвященная гипотезе ОСМ. Принимая во внимание вышеописанную гипотезу, Фирсов А. А. и соавторы смогли установить зависимость между селекцией устойчивых мутантов *S. aureus* и моделируемым значением ПФК/МПК фторхинолонов (Firsov et al., 2003). В работе моделировали режимы многократного введения моксифлоксацина, гатифлоксацина, левофлоксацина и ципрофлоксацина в диапазоне значений ПФК/МПК, обеспечивающих нахождение уровней концентрации антибиотиков на протяжении большей части интервала дозирования ниже МПК (вне ОСМ), между МПК и МПК_М (внутри ОСМ), а также – выше МПК_М (вне ОСМ). Изменение чувствительности стафилококка к воздействию на него антибиотика оценивали с помощью отношения МПК_{фин}/МПК_{исх}. В случае каждого из антибиотиков, когда фармакокинетический профиль находился преимущественно внутри ОСМ, наблюдалось развитие антибиотикорезистентности. Зависимость МПК_{фин}/МПК_{исх} от ПФК/МПК для данных, объединённых по всем фторхинолонам, была описана функцией Гаусса с высоким коэффициентом корреляции ($r^2 = 0,9$) (Рисунок 8). Авторы упомянутой работы также проанализировали данные по развитию резистентности *Bacteroides fragilis* к левофлоксацину и тровафлоксацину в динамической системе *in vitro*, полученные годом ранее в работе Peterson M. L. и коллег, в которой самим авторам установить зависимость «резистентность – ПФК/МПК» не удалось (Peterson et al., 2002). Данные этой работы после их реконструкции также удалось описать функцией Гаусса.

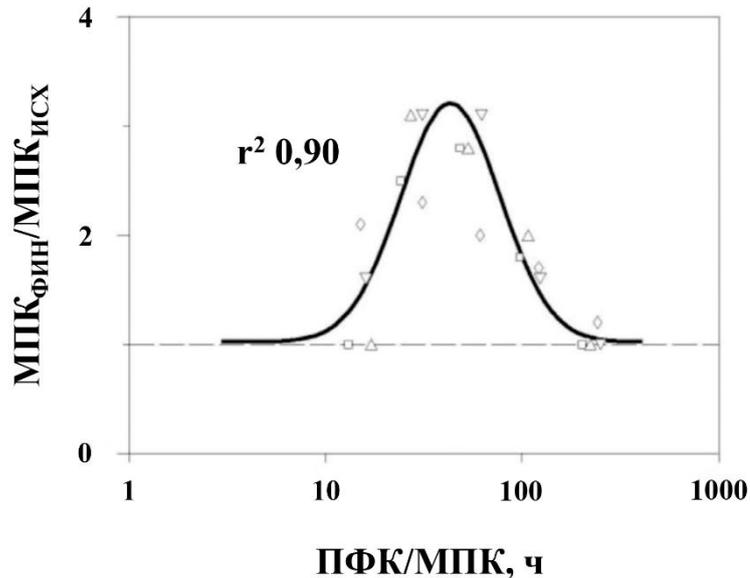


Рисунок 8. Зависимость между снижением чувствительности *S. aureus* и ПФК/МПК фторхинолонов. Объединённые данные по 3 штаммам и 4 антибиотикам (треугольники – моксифлоксацин, квадраты – левофлоксацин, ромбы – гатифлоксацин, перевёрнутые треугольники – ципрофлоксацин). По данным Firsov A. A. et al., 2003.

Возвращаясь к рассмотренному выше исследованию Klepser M. E. и соавторов (2001) (Klepser et al., 2001), наблюдаемое в этой работе развитие антибиотикорезистентности бактерий под воздействием фторхинолонов также удалось объяснить с позиций ОСМ. Например, если внимательно проанализировать представленные авторами данные, которые были показаны на рисунке 6, то можно заметить, что расположение точек на графике зависимости «МПК_{фин}/МПК_{исх} – ПФК/МПК» для каждого антибиотика по форме напоминает купол, поскольку максимальные потери чувствительности пневмококков к фторхинолонам происходили при минимальных и промежуточных значениях ПФК/МПК и не наблюдались при максимальных значениях ПФК/МПК (Рисунок 9).

По результатам последующих исследований, проведённых в динамических системах *in vitro*, применимость гипотезы ОСМ неоднократно подтверждалась в отношении фторхинолонов и грамположительных (Zinner et al., 2003; Campion et al., 2004, 2005; Tam et al., 2007; Firsov et al., 2008a, 2008b;

Liang et al., 2011), и грамотрицательных бактерий (Firsov et al., 2013, 2014, 2015a; Zinner et al., 2013; Strukova et al., 2015, 2016a, Olofsson et al., 2006, Gebru et al., 2011). Справедливость гипотезы ОСМ была доказана и в отношении антибиотиков других классов – глико- и липопептидов, оксазолидинонов (Firsov et al., 2006; Firsov et al., 2015).

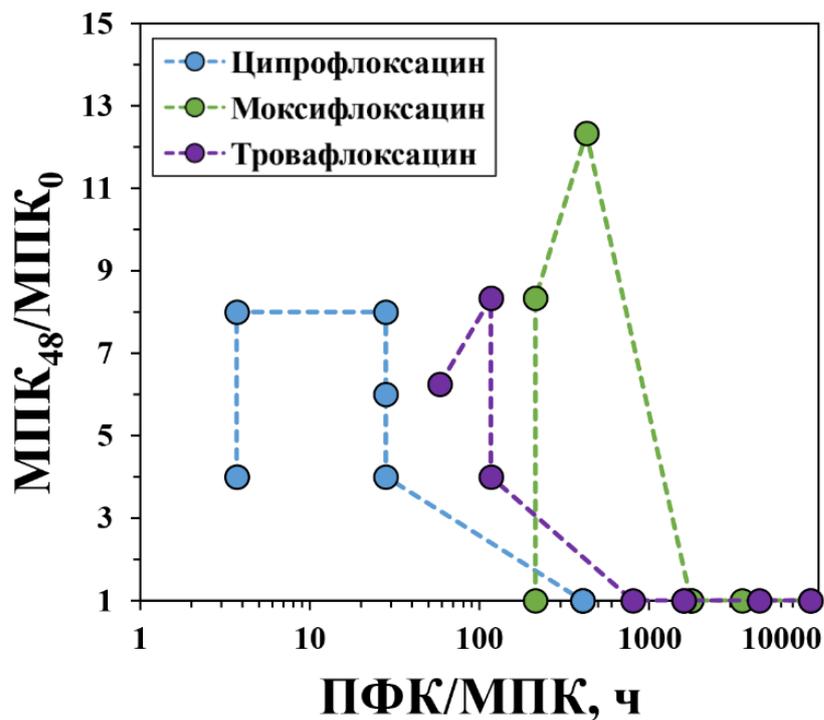


Рисунок 9. Зависимость изменения чувствительности *S. pneumoniae* к фторхинолонам, выраженной отношением $\text{МПК}_{\text{ФИН}}/\text{МПК}_{\text{ИСХ}}$, от моделируемых значений ПФК/МПК антибиотиков. Объединённые данные по 3 штаммам. По данным Klepser et al., 2001.

Вслед за успешным подтверждением применимости гипотезы ОСМ в отношении антибиотиков разных групп и бактерий разных видов в динамических системах *in vitro*, начали проводиться исследования, направленные на проверку применимости гипотезы ОСМ в условиях *in vivo*. Объектами таких исследований стали фторхинолоны с грамположительными бактериями (Croisier et al., 2004; Cui et al., 2006) и *Mycobacterium tuberculosis* (Almeida et al., 2007), гликопептиды (Zhu et al., 2012; Lenhard et al., 2016), а также бета-лактамы (Stearne et al., 2007; Goessens et al., 2007). В этих работах были получены доказательства принципиальной применимости гипотезы

ОСМ в отношении изученных пар антибиотик-патоген в условиях живого организма. Было показано, что развитие резистентности бактерий к антибиотику ассоциировано с режимами дозирования, при которых концентрации антибиотика преимущественно находились в пределах ОСМ. На фоне применения режимов антибиотикотерапии, при которых концентрации препарата оказывались преимущественно выше МПК_М (верхней границы ОСМ), резистентность не развивалась. Эти заключения, как правило, основывались только качественном сопоставлении данных, но не их функциональном анализе. Количественные соотношения между резистентностью бактерий и значениями ПФК/МПК антибиотика, демонстрирующие куполообразный характер зависимости, были установлены только в нескольких работах. Так, в *in vivo* модели пневмонии у кроликов зависимости между концентрацией мутантных клеток *Streptococcus pneumoniae*, выделяемых из ткани легкого, и значением ПФК/МПК гатифлоксацина, левофлоксацина или моксифлоксацина были описаны функцией Гаусса с высокими коэффициентами корреляции (r^2 0,7-0,8) (Croisier et al., 2004). Развитие резистентности *Enterobacter cloacae* к цефтизоксиму, выраженной долей мутантных клеток в % от общей численности популяции, в *in vivo* модели абсцесса у крыс также удалось описать функцией Гаусса с r^2 0,6 (Stearne et al., 2007).

Справедливость гипотезы ОСМ также была проверена в отношении линезолида, представителя новейшего класса антибактериальных препаратов – оксазолидинонов, и энтерококков (*Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*) (Boak et al., 2007; Zinner et al., 2008; Allen, Bierman, 2009; Va et al., 2010). В перечисленных работах было продемонстрировано, что под воздействием линезолида в дозах, обеспечивающих попадание концентраций антибиотика в ОСМ на протяжении большей части интервала дозирования, наблюдался выраженный рост мутантов, устойчивых к антибиотику. Когда концентрации препарата преимущественно находились выше верхней границы ОСМ, рост резистентных мутантов подавлялся.

Случай, когда развития резистентности *E. faecalis* к линезолиду в динамической системе не наблюдали (Ba et al., 2010), также может косвенно подтверждать применимость гипотезы ОСМ к линезолиду, если проанализировать результаты данного исследования с учётом феномена «закрытого» окна селекции мутантов. ОСМ «закрыто», если значения МПК и МПК_М антибиотика в отношении конкретного микроорганизма совпадают (МПК=МПК_М), что и наблюдалось в упомянутом исследовании. Поскольку ОСМ было «закрыто», концентрации антибиотика находились вне его пределов на протяжении всего эксперимента и развития резистентности к антибиотику не наблюдалось. Феномен «закрытого» ОСМ в данном случае может быть связан с крайне низкой частотой спонтанных мутаций ($<10^{-9}$), отвечающих за формирование резистентности к линезолиду, которая характерна для некоторых штаммов энтерококков (Silverman et al., 2001). По всей видимости, объект исследования принадлежал к числу таких штаммов. При частоте спонтанных мутаций $<10^{-9}$ резистентные к линезолиду мутанты могли отсутствовать даже в инокуляте для определения МПК_М, плотность клеток в котором составляет приблизительно 10^{11} КОЕ/мл.

Отдельного и более детального рассмотрения заслуживают исследования, направленные на изучение применимости гипотезы ОСМ в отношении пары «линезолид – *S. aureus*». При проведении экспериментов в динамической системе *in vitro* выявить резистентность стафилококков к линезолиду не удавалось как на фоне его применения только в терапевтически реализуемых дозах (Cha et al., 2003; LaPlante, Rybak, 2004), так и при варьировании моделируемых концентраций антибиотика в широком диапазоне (Smirnova et al., 2006; Ba et al., 2010). По всей видимости, как и в случае с энтерококками, это связано с феноменом «закрытого» ОСМ (МПК=МПК_М) из-за крайне низкой частоты спонтанных мутаций, отвечающих за формирование резистентности к линезолиду у стафилококков: 1 мутантная клетка на 10^9 - 10^{11} чувствительных (Miller et al., 2008; Clark et al., 2009; Locke et al., 2009b). Так, в упомянутой ранее работе Ва В. В. и соавторов

значения MPK_M линезолида в отношении обоих изученных штаммов *S. aureus* совпадали со значениями MPK антибиотика (Ba et al., 2010).

Особый интерес представляет исследование, проведенное Boak L. M. и соавторами, в котором было зафиксировано развитие резистентности золотистого стафилококка к линезолиду (Boak et al., 2007). Появление устойчивых мутантов *S. aureus* в популяции к моменту окончания антибиотикотерапии было ассоциировано с режимом, при котором линезолид вводили в виде непрерывной инфузии. Концентрация антибиотика постоянно поддерживалась на уровне, равном его MPK . Роста резистентности к линезолиду не наблюдалось в случае его введения в виде непрерывной инфузии, но в меньшей концентрации (в 4 раза ниже MPK). Резистентность к антибиотику также не была зафиксирована при его применении в дозах, соответствующих терапевтической и субтерапевтической (струйное введение), которые обеспечивали максимальные концентрации антибиотика, превышающие его MPK в 2-10 раз. Авторы рассматриваемой работы не устанавливали значения MPK_M линезолида в отношении изученных штаммов *S. aureus*, поэтому мы не можем оценить применимость гипотезы ОСМ. Тем не менее, учитывая низкую частоту спонтанных мутаций, отвечающих за формирование резистентности к линезолиду у стафилококков, можно предположить, что значения MPK_M линезолида могли быть близки к его MPK . В этом случае только на фоне инфузии, когда концентрации линезолида поддерживались на уровне его MPK , обеспечивалось постоянное (100%) присутствие уровня концентрации антибиотика в пределах ОСМ. В тех случаях, когда моделировали режимы со струйным введением антибиотика в динамическую систему, и в пределах интервала дозирования концентрация линезолида постоянно менялась, её уровни либо превышали предполагаемый уровень MPK_M , либо находились в пределах ОСМ в течение непродолжительного времени. Поскольку данное заключение основано на предположениях, результаты Boak L. M. и соавторов можно считать лишь

косвенным подтверждением применимости гипотезы ОСМ к паре «линезолид – *S. aureus*».

Принимая во внимание описанные сложности, возникающие при изучении закономерностей развития резистентности стафилококков к линезолиду, Фирсовым А.А. и коллегами было предложено оригинальное решение. Для обеспечения гарантированного присутствия спонтанных мутантов в инокуляте, стартовая популяция *S. aureus* была искусственно обогащена резистентными клетками, предварительно селекционированными из каждого изучаемого штамма (Струкова, 2010; Firsov et al., 2015b). Доля резистентных к линезолиду мутантов стафилококка в инокуляте, задаваемая в начале эксперимента, соответствовала 1 мутантной клетке на 10^8 чувствительных (имитация частоты спонтанных мутаций 10^{-8}). Это обеспечивало гарантированное присутствие устойчивых клеток стафилококка в экспериментальном инокуляте. По результатам фармакодинамических экспериментов со смешанным инокулятом обогащение популяции *S. aureus* резистентными мутантами происходило при нахождении концентраций линезолида в пределах ОСМ в течение большей части интервала дозирования, но прекращалось, когда уровни концентрации антибиотика преимущественно превышали уровень МПК_М (Рисунок 10).

Это исследование позволило однозначно подтвердить применимость гипотезы ОСМ в отношении линезолида и *S. aureus*. Вместе с тем, наличие связи между развитием резистентности золотистого стафилококка к линезолиду и моделируемым значением ПФК/МПК антибиотика, подтверждающее применимость концепции ОСМ, было описано только на примере одного штамма стафилококка. Кроме того, диапазон моделируемых значений ПФК/МПК линезолида не включал значения, при которых концентрации линезолида находились бы преимущественно в нижней части ОСМ. По этой причине установить полноценную зависимость «резистентность – ПФК/МПК» не удалось. Это обуславливает необходимость проведения дополнительных исследований с этим и другими штаммами *S.*

aureus в диапазоне значений ПФК/МПК, который бы позволил установить зависимость «резистентность – ПФК/МПК» и оценить ее инвариантность относительно штамма стафилококка.

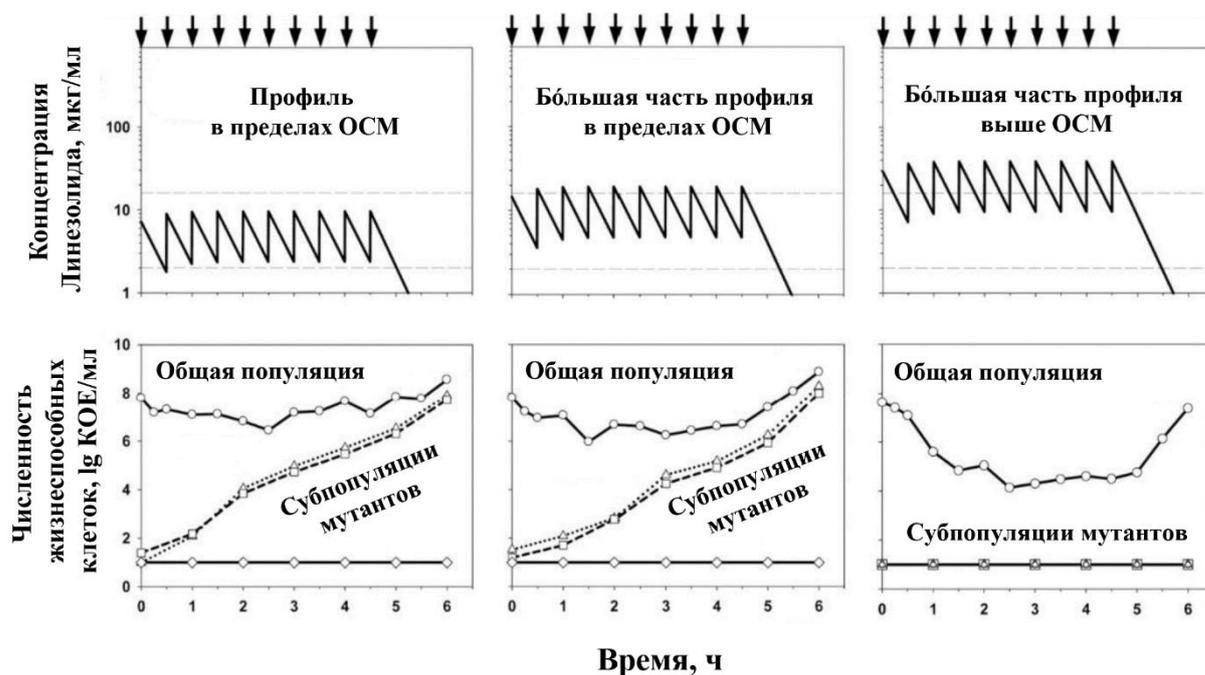


Рисунок 10. Моделируемые профили линезолида и изменения численности клеток общей популяции и резистентных к линезолиду субпопуляций *S. aureus*. Моменты введения линезолида обозначены стрелками. По Firsov et al., 2015b.

1.3.3 Фармакокинетико-фармакодинамические параметры для прогнозирования развития резистентности бактерий к антибиотикам

Изучение закономерностей развития резистентности бактерий к антибиотикам в динамических системах *in vitro* предполагает установление зависимости «резистентность – концентрация». Концентрации антибиотика при этом количественно учитываются при помощи фармакокинетико-фармакодинамических параметров, которые отражают как фармакокинетические характеристики антибиотика ($C_{\text{МАКС}}$, ПФК, $T_{1/2}$), так и его фармакодинамические свойства (МПК, МПК_М). Знание зависимости «резистентность – концентрация» даёт возможность прогнозировать развитие резистентности при терапевтических режимах дозирования антибиотика;

устанавливать пороговые значения параметров, ассоциированные с подавлением резистентности («антимутантные»), и сопоставлять их с терапевтически достижимыми, то есть использовать параметры в качестве предикторов «антимутантного» эффекта.

Параметр ПФК/МПК наиболее широко используется для отображения моделируемых концентраций антибиотика при проведении фармакодинамических экспериментов. Параметр ПФК/МПК_М – это аналог параметра ПФК/МПК, однако он учитывает активность антибиотика в отношении не чувствительных, а резистентных субпопуляций бактерий. С точки зрения поиска связи «резистентность – концентрация» использование параметра ПФК/МПК_М, а не ПФК/МПК представляется более логичным, поскольку он учитывает активность антибиотика в отношении именно резистентных клеток, а не чувствительных.

Наряду с параметрами, фармакокинетическая часть которых выражена через ПФК, существуют параметры, в которых связь между фармакокинетикой и фармакодинамикой антибиотика выражена временем. Это $T_{>МПК}$ (MacGowan et al., 2000, 2001) и $T_{>МПКМ}$ (Allen et al., 2003; Olofsson et al., 2006; Firsov et al., 2013, 2014) – время, в течение которого концентрация препарата превышает, соответственно, уровень его МПК и МПК_М в пределах интервала дозирования,. Подобно ПФК/МПК_М, параметр $T_{>МПКМ}$ учитывает активность антибиотика в отношении резистентных клеток бактерии. Ещё один важнейший параметр, определяемый на основании обеих границ ОСМ, – это $T_{ОСМ}$ – время, в течение которого концентрация антибиотика находится в интервале между МПК и МПК_М, то есть в пределах ОСМ (Firsov et al., 2003, 2004; Campion et al., 2004; Oloffson et al., 2006).

При установлении зависимости «резистентность – концентрация» наряду с фармакокинетико-фармакодинамическими параметрами, которые отражают роль фармакокинетики антибиотика в развитии «антимутантного» эффекта, используются параметры, позволяющие количественно оценить сам «антимутантный» эффект препарата. Эти параметры условно можно разделить

на 2 типа: «точечные» параметры, которые оценивают отдельно взятую стадию развития «антимутантного» эффекта, и интегральные параметры, которые позволяют описать эффект в целом.

«Точечные» параметры отражают «антимутантный» эффект антибиотика в определенный момент времени, на промежуточной или конечной стадии его развития. Параметр N_t (N_M) – численность резистентных к антибиотику клеток микроорганизма в момент времени t , как правило в конце эксперимента (Голикова и соавт., 2015). Недостатком данных параметров является то, что оценка «антимутантного» эффекта антибиотика зависит от времени, выбранного для определения величины N_t , когда как развитие «антимутантного» эффекта того или иного антибиотика может происходить с разной скоростью. Параметр $N_{\text{МАКС}}/N_{\text{ИСХ}}$ – отношение максимальной численности резистентных к антибиотику клеток микроорганизма, зарегистрированной в эксперименте ($N_{\text{МАКС}}$), к их исходной численности (Firsov et al., 2006). Данный параметр не учитывает возможные колебания численности мутантных клеток в эксперименте, которая, достигая максимального значения, может затем заметно снижаться. К «точечным» параметрам также относится параметр, отображающий отношение значения МПК антибиотика в отношении бактериальной популяции в конце эксперимента, $\text{МПК}_{\text{ФИН}}$, к его исходному значению, $\text{МПК}_{\text{ИСХ}}$, – $\text{МПК}_{\text{ФИН}}/\text{МПК}_{\text{ИСХ}}$ (Firsov et al., 2003). Недостатком данного параметра, как и других «точечных» параметров, является то, что он позволяет оценить «антимутантный» эффект антибиотика только в определённый момент и не учитывает динамику изменения численности бактерий под его воздействием во времени.

Интегральные параметры, в отличие от «точечных», суммируют изменения численности резистентных бактерий на протяжении всего периода наблюдения. Интегральный параметр ППК_M представляет собой площадь под кинетической кривой изменения численности устойчивых к антибиотику клеток бактерии, ограниченную временем и пределом количественного

определения устойчивых мутантов (Firsov et al., 2008b). Главное преимущество интегрального параметра $ППК_M$ перед точечными состоит в том, что при его вычислении учитываются все возможные колебания численности мутантных клеток на протяжении периода наблюдения, что может обеспечить более полную и надежную оценку «антимутантного» эффекта.

Принципиальная зависимость между эффектом антибиотика на резистентные субпопуляции бактерий («антимутантным» эффектом) и фармакокинетико-фармакодинамическими параметрами была установлена для ряда пар антибиотик-патоген. Наиболее подробно в этом отношении изучены фторхинолоны.

Научный коллектив лаборатории фармакокинетики и фармакодинамики ФГБНУ НИИНА под руководством Фирсова А. А. посвятил целую серию исследований изучению зависимости между развитием резистентности грамотрицательных бактерий к ципрофлоксацину и фармакокинетико-фармакодинамическими параметрами ($ПФК/МПК$ и $ПФК/МПК_M$) (Firsov et al., 2013; Strukova et al., 2016a, b). Подобные исследования проводились и ранее, однако из-за ряда методических недостатков, связанных с некорректным выбором исследуемых штаммов, у которых значения $МПК$ и $МПК_M$ не отличались (Olofsson et al., 2006), или моделированием узкого диапазона значений $ПФК/МПК$ (Nomma et al., 2007), результаты этих работ не могут быть использованы для проведения сравнительного функционального анализа.

Объектами изучения в работах Фирсова А. А. и соавторов, а также Струковой Е. Н. и соавторов, стали бактерии видов *E. coli* (Firsov et al., 2013), *K. pneumoniae* (Strukova et al., 2016b) и *P. aeruginosa* (Strukova et al., 2016a). Фармакокинетику ципрофлоксацина моделировали в широком диапазоне значений его концентрации, что в случае каждого из возбудителей обеспечивало нахождение уровней концентраций ципрофлоксацина как в диапазоне концентраций, ограниченном $ОСМ$, так и вне его. Гипотеза

существования ОСМ была подтверждена на примере зависимостей «ППК_М – ПФК/МПК» и «ППК_М – ПФК/МПК_М». При сравнении полученных зависимостей был отмечен бóльший разброс значений ПФК/МПК_М, чем ПФК/МПК, и точность описания данных на графике зависимости «ППК_М – ПФК/МПК_М» функцией Гаусса была ниже. Это свидетельствует о преимуществе параметра ПФК/МПК перед ПФК/МПК_М при его использовании в качестве предиктора резистентности грамотрицательных бактерий к фторхинолонам.

В случае с грамположительными бактериями и фторхинолонами (левофлоксацин, цiproфлоксацин), были получены противоположные результаты (Liang et al., 2011, Firsov et al., 2008b). С парой левофлоксацин-*S. aureus* было проведено исследование с целью сравнения параметров ПФК/МПК и ПФК/МПК_М как предикторов антибиотикорезистентности (Liang et al., 2011). Фармакокинетику антибиотика моделировали в широком диапазоне значений ПФК/МПК, что обеспечивало присутствие профилей левофлоксацина преимущественно в пределах ОСМ, а также вне его. Корреляционный анализ показал, что использование параметра ПФК/МПК_М, но не ПФК/МПК, позволяет прогнозировать «антимутантный» эффект антибиотика. К таким же выводам пришли Фирсов А. А. и соавторы, когда изучали в динамической системе *in vitro* «антимутантный» эффект цiproфлоксацина в отношении золотистого стафилококка (Firsov et al., 2008b). Ранее к аналогичным выводам пришли и исследователи, проводившие изучение развития резистентности *S. pneumoniae* к моксифлоксацину и левофлоксацину (Nomma et al., 2007, Allen et al., 2004). Поскольку эти работы проводились либо при моделировании всего двух режимов дозирования антибиотиков (Allen et al., 2004), либо с небольшим количеством штаммов пневмококков (2) (Nomma et al., 2007), возможность использования их результатов для проведения функционального анализа была ограничена.

Вопрос поиска предиктора развития резистентности бактерий в условиях *in vivo* изучен недостаточно. Есть лишь несколько работ,

проведенных с фторхинолонами и грамположительными бактериями (Croisier et al., 2004, Cui et al., 2006). Согласно опубликованным данным, параметры ПФК/МПК и ПФК/МПК_М одинаково хорошо коррелировали с остаточной численностью мутантных клеток пневмококка или золотистого стафилококка в инфицированных тканях кроликов по завершении антибиотикотерапии гатифлоксацином или левофлоксацином, соответственно.

Среди других потенциальных предикторов развития антибиотикорезистентности большой интерес представляет параметр $T_{\text{ОСМ}}$. Этот параметр наиболее ассоциирован с теорией окна резистентности: в соответствии с ней вероятность селекции резистентных мутантов должна зависеть от продолжительности нахождения уровней концентрации препарата в пределах ОСМ. На этом основании можно предположить, что данный параметр будет оптимальным для предсказания развития устойчивости к антибиотикам.

Вопреки ожиданиям, по результатам ряда работ параметр $T_{\text{ОСМ}}$ получил негативную оценку как потенциальный предиктор развития резистентности к фторхинолонам (Campion et al., 2004; Firsov et al., 2004; Oloffson et al., 2006). Фирсов А. А. и коллеги предположили, что недостаток параметра $T_{\text{ОСМ}}$, снижающий его надёжность как предиктора развития антибиотикорезистентности, состоит в том, что он не учитывает положение профиля антибиотика внутри ОСМ (Firsov et al., 2008a). Согласно мнению авторов, это положение влияет на интенсивность обогащения популяции резистентными клетками. Авторы предположили, что ОСМ гетерогенно: интенсивность селекции устойчивых клеток происходит неодинаково в зависимости от того, в какой части «окна» преимущественно находятся уровни концентрации антибиотика. С целью проверки предположения о гетерогенности ОСМ были изучены процессы развития резистентности *S. aureus* к ципрофлоксацину при моделировании его уровней концентрации в верхней или нижней части ОСМ. Результаты исследования показали, что при одном и том же значении $T_{\text{ОСМ}}$ рост мутантов проходил интенсивнее, когда

профиль антибиотика находился в нижней части ОСМ. Величины ППК_М для мутантов, устойчивых к 2×, 4× и 8×МПК ципрофлоксацина заметно отличались в этом случае и более чем в два раза превышали величины ППК_М, соответствующие фармакокинетическим профилям, находившимся преимущественно в верхней части ОСМ (Рисунок 11).

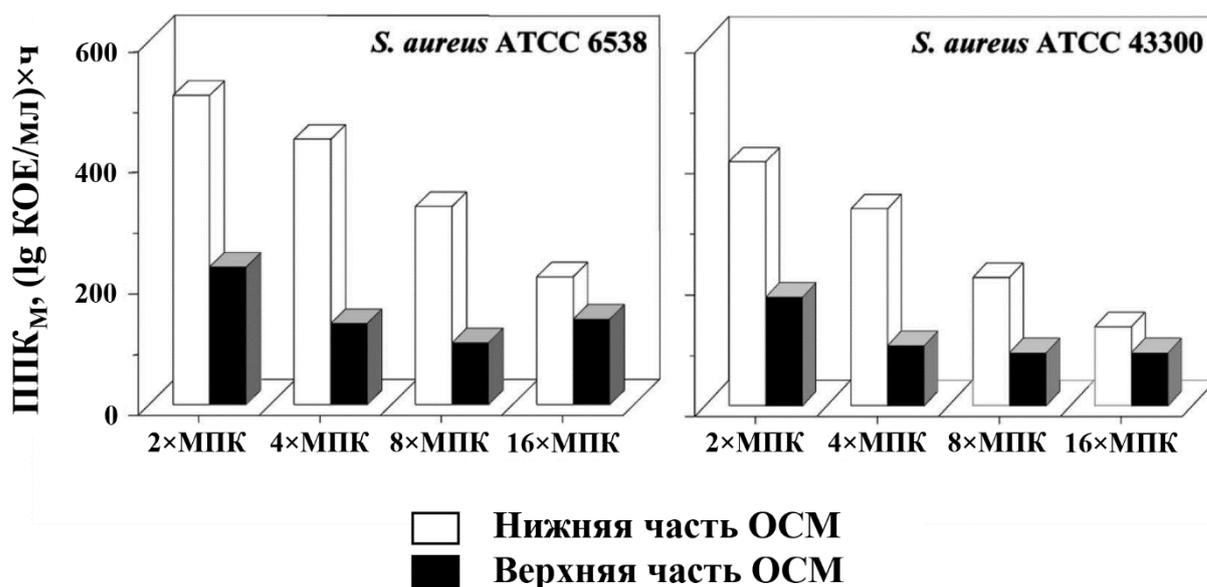


Рисунок 11. Интенсивность обогащения популяции мутантами *S. aureus*, резистентными к ципрофлоксацину, при нахождении концентраций антибиотика преимущественно в верхней или нижней половине ОСМ при одинаковом значении $T_{\text{ОСМ}}$. По Firsov et al., 2008a.

Указывает ли такая «двойственность» параметра $T_{\text{ОСМ}}$ на его непригодность как предиктора развития антибиотикорезистентности? Ведь одно и то же значение $T_{\text{ОСМ}}$ может быть ассоциировано как с относительно высокими уровнями резистентности к антибиотику, так и с относительно низкими. Однако, если мысленно разделить ОСМ на две части (нижнюю и верхнюю), то для каждой из них можно будет проследить свою зависимость между уровнями резистентности и концентрациями антибиотика. Такие зависимости были установлены в последующем исследовании с ципрофлоксацином и *E. coli* (Firsov et al., 2014). Так, без учета положения профиля ципрофлоксацина относительно ОСМ, зависимость «ППК_М – $T_{\text{ОСМ}}$ » характеризовалась низким коэффициентом корреляции (0,61): наблюдался

заметный разброс величин ППК_М при схожих величинах $T_{\text{ОСМ}}$ (рисунок 12, левая панель).

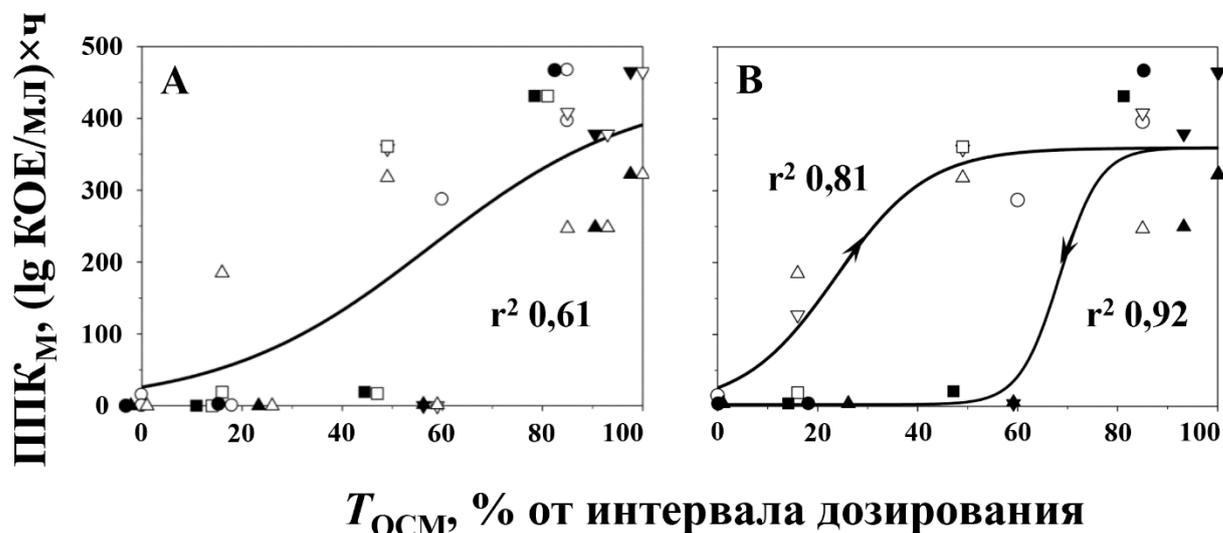


Рисунок 12. Зависимость ППК_М для мутантов *E. coli*, резистентных к 8 \times МПК ципрофлоксацина, от $T_{\text{ОСМ}}$ при описании данных, объединённых по 4 штаммам (обозначены разными символами), единой сигмоидной функцией (А) или двумя функциями (Б), каждая из которых описывает точки, принадлежащие восходящей (белые символы) или нисходящей (чёрные символы) ветви кривой ППК_М-ПФК/МПК. По Firsov et al., 2014.

После описания данных не одной, а двумя сигмоидными функциями (первая относилась к точкам, отвечающим условию $T_{>\text{МПК}_M} = 0$, а вторая – $T_{>\text{МПК}_M} > 0$ (Рисунок 12 правая панель)) корреляция между значениями ППК_М и $T_{\text{ОСМ}}$ для каждой из зависимостей значительно возросла (r^2 0,81 и 0,92, соответственно). Неравномерность процессов селекции устойчивых мутантов в зависимости от того, в какой части ОСМ находится профиль, была объяснена авторами наличием гистерезиса – феномена, возникающего в результате воздействия антибиотика на клетки бактерий.

На вопрос о применимости параметра $T_{\text{ОСМ}}$ как предиктора развития антибиотикорезистентности, можно ответить следующее. При использовании параметра $T_{\text{ОСМ}}$ для корректной интерпретации результатов необходимо учитывать положение профиля антибиотика относительно ОСМ. В качестве критерия, применимого для разделения ОСМ на верхнюю и нижнюю части, выступает параметр $T_{>\text{МПК}_M}$ (значение параметра соответствует 0 или >0).

Параметр $T_{>МПКМ}$ сам по себе также представляет интерес в качестве предиктора антибиотикорезистентности. К сожалению, на сегодняшний день прогностический потенциал этого параметра изучен недостаточно, есть лишь разрозненные данные, не позволяющие достоверно оценить его надежность как предиктора резистентности. По результатам исследований в динамических системах *in vitro* с *S. pneumoniae* (Allen et al., 2003) и *E. coli* (Firsov et al., 2013) параметр $T_{>МПКМ}$ коррелировал с развитием резистентности. Однако в другом исследовании такой корреляции обнаружено не было (Oloffson et al., 2006). В ранее упомянутом исследовании с парой гатифлоксацин – *S. pneumoniae*, проведенном *in vivo*, параметр $T_{>МПКМ}$ наиболее точно описывал развитие антибиотикорезистентности пневмококков к фторхинолону в зависимости от режима его дозирования (r^2 0,86) (Croisier et al., 2004). Однако это было справедливым только в тех случаях, когда значение $T_{>МПКМ}$ было выше нуля.

По результатам приведенного анализа можно заключить, что корреляции между значениями ПФК/МПК и ПФК/МПК_М и уровнями резистентности к фторхинолонам, установленные в исследованиях *in vitro*, зависели от принадлежности бактерии к группе грамположительных или грамотрицательных. Вопрос о применимости этих заключений к антибиотикам, относящимся к другим классам, остается открытым в связи с его недостаточной изученностью. Насколько нам известно, единственной работой, посвященной изучению этих вопросов с антибиотиками групп липо- и гликопептидов, ванкомицином и даптомицином, при их действии на *S. aureus*, является исследование Фирсова А. А. и соавторов (Firsov et al., 2006). По результатам этого исследования ни один из изученных параметров не характеризовался высоким прогностическим потенциалом: параметр ПФК/МПК слабо коррелировал с развитием резистентности (r^2 0,64-0,68), а для параметра ПФК/МПК_М корреляции с селекцией устойчивых мутантов вовсе не было обнаружено. Слабая корреляция с резистентностью наблюдалась и в случае с параметром $T_{ОСМ}$ (r^2 0,50-0,60). Однако при анализе зависимостей «МПК_{фин}/МПК_{исх} – $T_{ОСМ}$ » и «lg $N_{макс}/N_{исх}$ – $T_{ОСМ}$ » авторы не

учитывали расслоение данных согласно положению фармакокинетического профиля антибиотика относительно ОСМ. Если разделить данные в зависимости от того, к какой части ОСМ они относятся (то есть когда $T_{>МПК_M} = 0$ или $T_{>МПК_M} > 0$), и описать их двумя сигмоидными функциями, как это было сделано в ранее рассмотренном исследовании Фирсова А. А. и соавторов (Firsov et al., 2014), то уровень корреляции заметно повышается (r^2 0,8-0,8).

Малоизученным в плане установления зависимости между резистентностью и фармакокинетико-фармакодинамическими параметрами, а также поиска лучшего предиктора развития резистентности является представитель нового класса оксазолидинонов – линезолид. Предположить какой из известных предикторов будет лучше коррелировать с развитием резистентности бактерий к линезолиду не представляется возможным. Особенностью линезолида в отличие от фторхинолонов и большей части других антибиотиков является низкая вариабельность по чувствительности к этому антибиотику между штаммами как стафилококков, так и энтерококков. Практически все штаммы характеризуются очень близкими значениями МПК линезолида и вследствие этого «выглядят одинаково», если их сравнивать по этому показателю. В то же время штаммы могут отличаться по своей способности к образованию резистентных мутантов в популяции, и это должны отображать значения $МПК_M$, а, следовательно, и параметры, рассчитанные на его основе. С этой точки зрения можно предполагать, что корреляция между резистентностью и значениями параметра ПФК/ $МПК_M$, а также $T_{>МПК_M}$ или $T_{ОСМ}$, но не ПФК/МПК будет лучше. На сегодняшний день вопрос о справедливости этих предположений остаётся открытым.

1.4 Фармакокинетико-фармакодинамические исследования в динамических системах *in vitro* при моделировании комбинированной терапии линезолидом и даптомицином

Сообщения о выделении в клинике бактерий, резистентных к линезолиду и даптомицину (см. Раздел 1.5), указывают на то, что режимы дозирования этих препаратов в ряде случаев оказываются неоптимальными. Одним из способов усиления «антимутантного» эффекта антибиотика в подобных случаях является его применение в более высокой дозе. Однако возможность выхода за верхнюю границу терапевтического диапазона препарата при превышении рекомендованных доз антибиотика сопряжена с увеличением риска развития нежелательных лекарственных реакций. Одним из перспективных методов борьбы с развитием антибиотикорезистентности является использование комбинаций антибиотиков.

1.4.1 Применение линезолида и даптомицина в комбинации при лечении инфекционных заболеваний в клинике

Линезолид и даптомицин применяются для терапии тяжёлых энтерококковых и стафилококковых инфекций: бактериемии, эндокардита и менингита. Как правило, это спасительная терапия тяжелобольных пациентов после сложных операций, а также больных, у которых инфекционные заболевания развиваются на фоне поражений внутренних органов и иммунной системы. Вместе с тем, литературные данные об эффективности применения комбинации линезолида с даптомицином в клинике крайне ограничены. Le J. и коллеги, проводившие комбинированную терапию энтерококкового менингита линезолидом и даптомицином, отмечают, что выбор линезолида основывался на предыдущих сообщениях об излечении данного инфекционного заболевания с его помощью, а даптомицин был добавлен с целью предотвращения развития устойчивости *E. faecium* к линезолиду,

которое было зафиксировано в других случаях монотерапии менингита оксазолидиноном (Le et al., 2010).

1.4.2 Изучение фармакодинамики линезолида и даптомицина в комбинации *in vitro* и *in vivo*

Изучению взаимодействия и антибактериального эффекта линезолида в комбинации с даптомицином посвящён ряд работ, проведённых *in vitro* в статических условиях и в динамических системах.

Тип взаимодействия между линезолидом и даптомицином методом «шахматной доски» был охарактеризован как синергизм в отношении всех изученных штаммов *E. faecium*, *E. faecalis* (Entenza et al., 2014) и большей части штаммов *S. aureus*, резистентных к метициллину (MRSA) и чувствительных к даптомицину (Aktas, Derbentli, 2017; Lee et al., 2019). Применительно к стафилококкам, нечувствительным к даптомицину, характер взаимодействия антибиотиков в комбинации был охарактеризован, как индифферентный или аддитивный (Lee et al., 2019).

Аналогичные результаты были получены и в экспериментах по изучению кинетики гибели энтерококков под воздействием постоянных концентраций линезолида и даптомицина, применяемых по отдельности и в присутствии друг друга (Entenza et al., 2014). Тип взаимодействия антибиотиков был оценен как синергизм или индифферентность.

Результаты, полученные в статических условиях, когда концентрации антибиотиков постоянны, не учитывают их фармакокинетические свойства. Следовательно, на основании таких результатов можно провести лишь предварительную оценку характера взаимодействия двух препаратов. Более достоверные результаты могут быть получены в динамических системах *in vitro*, которые позволяют изучать фармакодинамику антибиотиков при фармакокинетически обусловленных изменениях их концентрации.

В целом, при некоторой противоречивости результатов исследований в динамических системах *in vitro*, бóльшая часть работ свидетельствует о том, что комбинация линезолида с даптомицином характеризуется сравнимым или более слабым эффектом, чем даптомицин в отдельности (сравнение эффекта проводилось с даптомицином как с более активным антибиотиком, чем линезолид) (Parra-Ruiz et al., 2012, Steed et al., 2010; Luther, LaPlante, 2015).

Лишь в одном исследовании наблюдали заметное усиление антимикробного эффекта линезолида с даптомицином по сравнению с таковым даптомицина. Фармакодинамику антибиотиков и их комбинации изучали в отношении плёнкообразующих штаммов *S. aureus* в динамической системе *in vitro* (Parra-Ruiz J. et al., 2012). Результаты другого исследования, также проведённого с плёнкообразующими штаммами *S. aureus*, свидетельствуют о сравнимом или более слабом антистафилококковом эффекте комбинации линезолид-даптомицин по сравнению с таковым даптомицина (Luther, LaPlante, 2015). Авторы ещё одного исследования с данными объектами в динамической системе *in vitro*, где оценивался эффект препаратов при сочетанном или отдельном их применении, также не отмечали преимущества комбинации перед даптомицином (Steed et al., 2010).

В исследовании *in vivo* на модели имплантат-ассоциированного стафилококкового остеомиелита мышей, сопровождаемого образованием биоплёнок, комбинация линезолид-даптомицин характеризовалась эффективностью, сравнимой с таковой при монотерапии даптомицином и линезолидом (Jørgensen et al., 2016).

Отсутствие явных преимуществ комбинации линезолид-даптомицин по сравнению с даптомицином в плане антистафилококкового эффекта по результатам исследований *in vitro* и *in vivo*, может указывать на невысокую перспективность применения данной комбинации в клинике. Вместе с тем, эффект комбинации антибиотиков в отношении общей популяции бактерий не всегда коррелирует с их эффектом в отношении резистентных субпопуляций, то есть с «антимутантным» эффектом. Ярким примером тому могут стать

результаты исследования по изучению фармакодинамики комбинации линезолида с другим антистафилококковым антибиотиком, гентамицином, в динамической системе *in vitro* (Zinner et al., 2008). Несмотря на заметное ослабление эффекта данной комбинации в отношении *S. aureus* по сравнению с эффектом гентамицина в отдельности, селекция мутантов, резистентных к линезолиду была подавлена полностью, а к гентамицину – частично.

В тех случаях, когда эффект комбинированной антибиотикотерапии заметно превосходит или наоборот оказывается ниже такового при монотерапии, вопрос об «антимутантном» эффекте этой комбинации отходит на второй план. Если же при сочетанном применении антибиотиков наблюдается сравнимый с монотерапией эффект, способность комбинации препаратов подавлять развитие резистентности может стать решающим фактором при выборе стратегии лечения в пользу данной комбинации. Принимая во внимание данное обстоятельство, можно заключить, что проведение исследований, направленных на изучение эффекта комбинации линезолида с даптомицином в отношении как общей популяции бактерий, так и устойчивых субпопуляций, является актуальным.

1.4.3 Изучение эффекта комбинации линезолида и даптомицина в отношении устойчивых клеток бактерий *in vitro*

Изучению эффекта комбинации линезолид-даптомицин в отношении резистентных субпопуляций бактерий с применением динамических систем *in vitro* посвящено всего несколько работ (Steed et al., 2010; Parra-Ruiz et al., 2012; Luther, LaPlante, 2015). Авторам этих исследований не удалось выявить развитие резистентности ни к линезолиду, ни к даптомицину вне зависимости от моделируемого режима применения антибиотиков, при их применении в отдельности или в сочетании друг с другом. Причиной того, что резистентные к линезолиду клетки не были обнаружены в эксперименте, могла стать крайне низкая частота возникновения в популяции мутантов, резистентных к этому

антибиотику (Miller et al., 2008; Clark et al., 2009; Locke et al., 2009b). В случае с даптомицином можно предположить, что очень высокие концентрации антибиотика, которые воспроизводили в рассматриваемых исследованиях (дозы даптомицина составляли 6 и/или 10 мг/кг каждые 24 ч), сами по себе подавляли рост резистентных мутантов (Steed et al., 2010). К сожалению, авторы не определяли значения MPK_M даптомицина в отношении изучаемых штаммов *S. aureus*, и мы не можем оценить, как фармакокинетический профиль антибиотика соотносился с ОСМ даптомицина в каждом случае.

В связи с отсутствием данных об «антимутантном» эффекте комбинации линезолид-даптомицин, были проанализированы результаты исследований с другими комбинациями антибиотиков, в состав которых входил линезолид или даптомицин (Firsov et al., 2017; Zinner et al., 2018; Golikova et al., 2019). Исследования проводились с такими комбинациями антибиотиков, как линезолид-гентамицин, линезолид-рифампицин и даптомицин-рифампицин.

Фирсов А. А. и соавторы разработали оригинальный фармакокинетически-обоснованный подход к прогнозированию «антимутантного» эффекта антибиотиков при их сочетанном применении. В основе этого подхода лежат следующие соображения. Известно, что в случае сочетанного применения двух антибиотиков значения MPK_M каждого из них могут изменяться под влиянием второго препарата (Zhanel et al., 2006; Cai et al., 2012; Liu et al., 2013; Wu et al., 2013; Wei et al., 2015). В таком случае, значение верхней границы ОСМ антибиотика (MPK_M) снижается или повышается. Следовательно, в фармакодинамических экспериментах с данной комбинацией препаратов интенсивность роста резистентных мутантов может соответственно снижаться, так как $T_{>MPK_M}$ возрастает, или наоборот возрастать, так как $T_{>MPK_M}$ снижается. Однако возникает вопрос: при каком соотношении концентраций антибиотиков необходимо оценивать значения их MPK_M в присутствии друг друга, чтобы эти значения достоверно отображали верхнюю границу ОСМ, и их можно было бы использовать для прогнозирования «антимутантного» эффекта? Ведь в условиях организма и в динамической

системе концентрации антибиотиков изменяются в зависимости от периода их полувыведения и, следовательно, соотношения концентраций препаратов всё время изменяются. Решение, предложенное Фирсовым А. А. и соавторами, учитывает фармакокинетические свойства антибиотиков при расчете соотношения их концентраций для оценки значений $МПК_M$ в присутствии друг друга. Как известно, параметр ПФК отражает фармакокинетические свойства антибиотика. Тогда соотношение тех значений ПФК антибиотиков, которые моделируются в эксперименте, может быть использовано при определении соответствующих значений $МПК_M$ антибиотиков в присутствии друг друга.

Общий вид связи между снижением значения $МПК_M$ антибиотика в присутствии второго препарата и подавлением развития резистентности к этому антибиотику в фармакодинамических экспериментах с комбинацией препаратов показан на Рисунке 13.

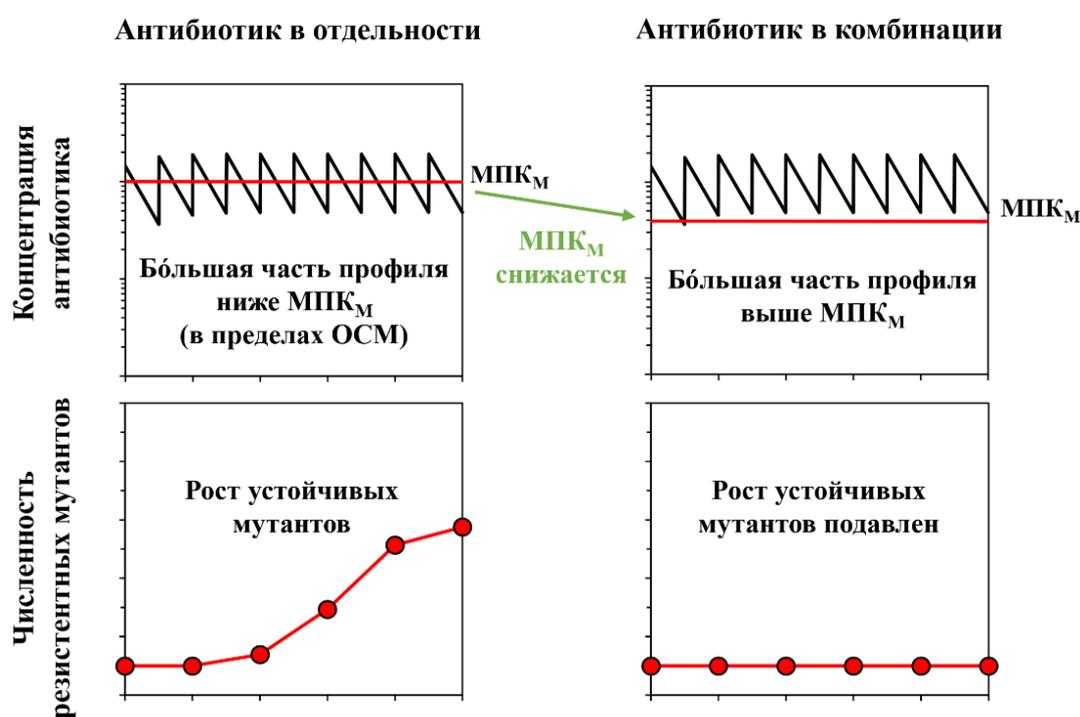


Рисунок 13. Связь между снижением значения $МПК_M$ антибиотика в присутствии второго препарата и развитием резистентности к этому антибиотику в фармакодинамических экспериментах при моделировании моно- и комбинированной терапии. Соотношение ПФК препаратов при проведении экспериментов в динамической системе *in vitro* равно соотношению их концентраций при определении $МПК_M$.

Применимость указанного подхода была подтверждена при изучении развития резистентности *S. aureus* на фоне моделируемой терапии комбинациями антибиотиков, такими как линезолид-гентамицин (Zinner et al., 2018), линезолид-рифампицин (Firsov et al., 2017) и даптомицин-рифампицин (Golikova et al., 2019).

Как показали Zinner S. H. и соавторы, снижение значений MPK_M линезолида и гентамицина в присутствии друг друга (в 2 и 7 раз, соответственно) приводило к соответствующему возрастанию значений $T_{>MPK_M}$ для каждого из них (на ~50 и 30% соответственно) (Zinner et al., 2018). Такое увеличение продолжительности пребывания уровней концентрации препарата выше MPK_M было достаточным для того, чтобы селекция резистентных мутантов *S. aureus* была полностью или частично подавлена, когда антибиотики применялись в комбинации. Значения $ППК_M$ при моделировании моно- и комбинированной терапии линезолидом и гентамицином, соотнесённые с соответствующими значениями $T_{>MPK_M}$, показаны на Рисунке 14. Проведённый анализ позволил объяснить, почему комбинация линезолид-гентамицин, несмотря на установленный антагонизм антибиотиков при их действии на общую популяцию стафилококка, характеризовалась выраженным «антимутантным» эффектом.

Применимость фармакокинетически-обоснованного подхода к оценке значений MPK_M антибиотиков и прогнозированию их «антимутантного» эффекта была подтверждена на примере только нескольких комбинаций препаратов, что обуславливает необходимость изучения применимости данного подхода для других сочетаний антибиотиков.

Режимы дозирования антибиотиков

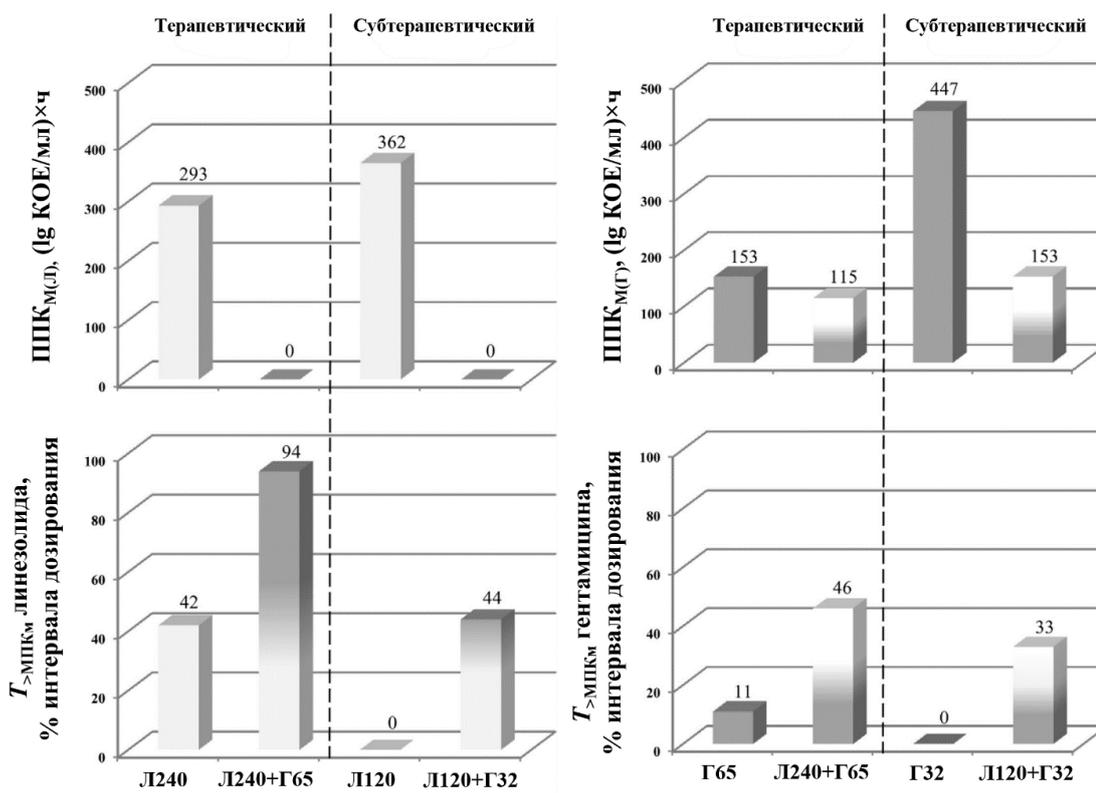


Рисунок 14. Значения ППК_М для мутантов *S. aureus*, устойчивых к 4×МПК линезолида (ППК_{М(Л)}) и гентамицина (ППК_{М(Г)}), и соответствующие значения $T_{>МПКМ}$. По Zinner et al., 2018.

В вышеописанных исследованиях изменение интенсивности «антимутантного» эффекта антибиотиков соответствовало изменениям $T_{>МПКМ}$, что указывает на возможность использования данного параметра как предиктора развития антибиотикорезистентности, в том числе при комбинированном применении антибиотиков. Однако данный параметр не может быть использован для «антимутантных» прогнозов в тех случаях, когда фармакокинетический профиль антибиотика находится ниже верхней границы ОСМ, поскольку тогда значение $T_{>МПКМ}$ всегда равно нулю. Принимая во внимание указанное ограничение, Голикова М. В. и соавторы (2019) предложили новый предиктор развития устойчивости к антибиотикам – интегральный параметр ПОМПК_М (площадь, ограниченная фармакокинетическим профилем антибиотика и его МПК_М, Area Around МПК_М) (Рисунок 15) (Golikova et al., 2019).

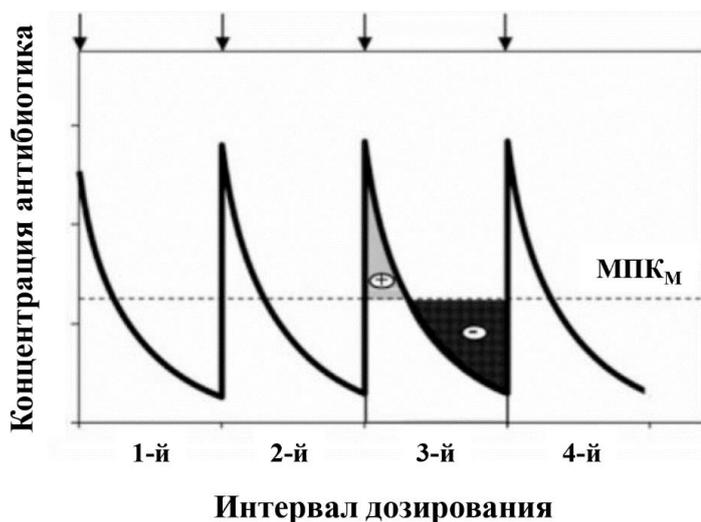


Рисунок 15. Схема определения ПОМПК_M . Моменты введения антибиотика обозначены стрелками.

Величина ПОМПК_M – это арифметическая сумма площади под кривой «концентрация антибиотика-время» над МПК_M (положительная величина) и площади над кривой «концентрация антибиотика-время» ниже МПК_M (отрицательная величина). Значение параметра ПОМПК_M может быть положительным, отрицательным или равно нулю. Особенность данного параметра состоит в том, что в отличие от $T_{>\text{МПК}_M}$, ПОМПК_M отражает положение фармакокинетического профиля относительно уровня МПК_M независимо от того, находятся ли концентрации всегда ниже МПК_M или превышают его. Чем ниже или выше уровни концентраций антибиотика, тем ниже или выше значения ПОМПК_M при данном значении МПК_M .

При использовании данного параметра удалось установить связь между его значениями и развитием резистентности золотистого стафилококка к даптомицину и рифампицину, применяемым по отдельности или в комбинации. Параметр ПОМПК_M отображал изменения роста резистентности и в тех случаях, когда уровни концентраций антибиотика не превышали значений МПК_M , и значение параметра $T_{>\text{МПК}_M}$ всегда было равно нулю (Рисунок 16). Как показали результаты данной работы, параметр ПОМПК_M

можно рассматривать в качестве предиктора развития антибиотикорезистентности.

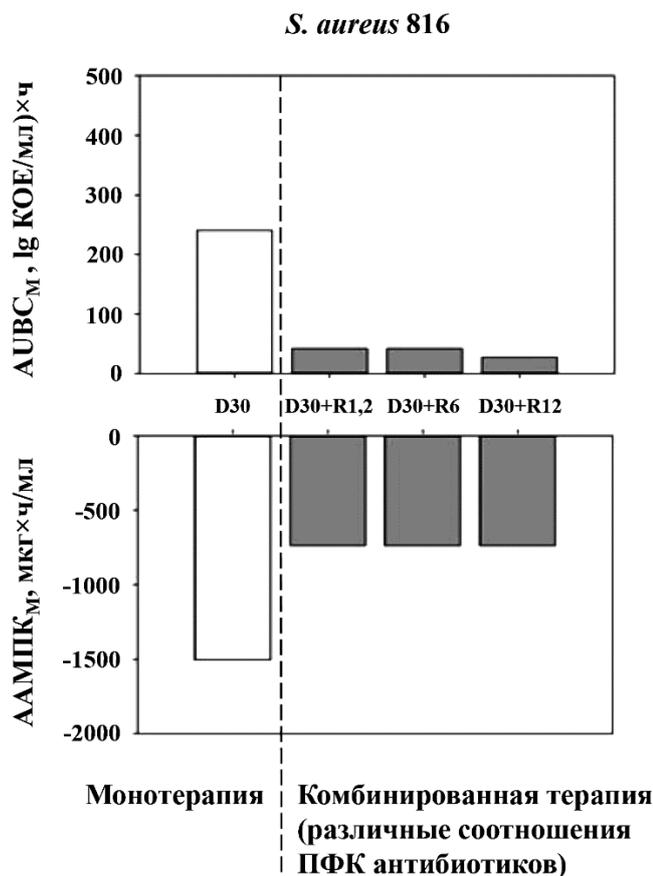


Рисунок 16. Соотношение между ППК_М для мутантов *S. aureus*, устойчивых к 2×МПК даптомицина, и соответствующими значениями ПОМПК_М даптомицина в отдельности и в комбинации с рифампицином при различных соотношениях ПФК антибиотиков. Во всех случаях $T_{>МПК_М} = 0$.

1.5 Линезолид и даптомицин: характеристика антибиотиков

1.5.1 Линезолид

Линезолид – синтетический антимицробный препарат, первый представитель класса оксазолидинонов (Рисунок 17). Он является бактериостатическим антибиотиком и обладает активностью в отношении грамположительных бактерий. Антимицробное действие линезолида обусловлено ингибированием синтеза белка в рибосомах бактериальной клетки: молекула препарата связывается с рибосомной РНК 50S субъединицы

бактериальной рибосомы, что препятствует образованию комплекса инициации и нарушает процесс транслокации (Shaw, Barbachyn, 2011).

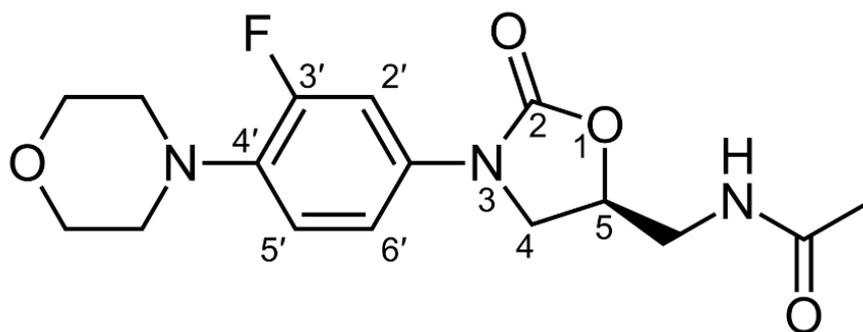


Рисунок 17. Химическая структура линезолида. (S)-N-({3-[3-фторо-4-(морфонил-4-ил)фенил]-2-оксо-1,3-оксазолидин-5-ил}метил)ацетамид.

Линезолид активен в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и *Enterococci*, включая устойчивые к другим антибиотикам штаммы. К категории чувствительных относятся штаммы стафилококков и энтерококков, которые характеризуются значениями МПК линезолида ≤ 4 мкг/мл, к категории устойчивых – при значении МПК линезолида ≥ 4 мкг/мл (CLSI, 2014). Чувствительные к линезолиду стрептококки характеризуются значениями МПК антибиотика ≤ 2 мкг/мл, а устойчивые – МПК ≥ 2 мкг/мл. Типичные значения МПК₅₀ и МПК₉₀ линезолида в отношении как стафилококков, так и энтерококков, включая устойчивые к другим антибиотикам штаммы (в том числе к ванкомицину), не превышают 1 и 2 мкг/мл, соответственно, а в отношении пневмококков – не превышают 1 и 2 мкг/мл, соответственно (Pfaller et al., 2017; Mendes et al., 2018).

Линезолид одобрен к клиническому применению с 2000 г, оригинальный лекарственный препарат – Зивокс (Zyvox). Линезолид применяется, в первую очередь, для терапии инфекций, вызванных резистентными к метициллину и ванкомицину штаммами *S. aureus*, *E. faecalis* и *E. faecium* (ZYVOX (linezolid). Pfizer medical information. URL: <https://www.pfizermedicalinformation.com/en-us/zyvox?section=indications->

usage; Diekema, Jones, 2001; Birmingham et al., 2003). Препарат применяют в виде внутривенной инфузии продолжительностью 30-120 минут и перорально. Рекомендованный режим дозирования линезолида для взрослых и детей старше 12 лет – 600 мг каждые 12 часов, для новорождённых и детей младше 12 лет – 10 мг/кг каждые 8 ч. Рекомендуемая продолжительность курса лечения составляет от 10 до 28 дней, в зависимости от тяжести течения инфекционного заболевания (ZYVOX (linezolid). Pfizer medical information. URL:<https://www.pfizermedicalinformation.com/en-us/zyvox?section=indications-usage>). Максимальная концентрация линезолида в плазме крови после применения дозы 600 мг перорально или в виде инфузии составляет 12-18 мкг/мл, а величина ПФК при рекомендованном режиме дозирования приблизительно равна 200 мкг×ч/мл (MacGowan, 2003; Meagher et al., 2003). Период полувыведения линезолида составляет 5-7 ч (Stalker, Jungbluth, 2003). Связь с белками плазмы составляет около 31%. Линезолид хорошо проникает в большинство органов и тканей человека, преодолевает гематоэнцефалический барьер, способен проникать внутрь клеток макроорганизма (Bouza, Munoz, 2001; Conte et al, 2002; Rana et al., 2002).

Поскольку линезолид является синтетическим препаратом и механизм его действия специфичен, вероятность обнаружения резистентных к нему природных мутантов довольно низкая. Наиболее редко возникновение спонтанных мутаций, приводящих к устойчивости к линезолиду, наблюдается у стафилококков: частота мутаций составляет 10^{-9} - 10^{-11} (Drago et al., 2008; Miller et al., 2008; Clark et al., 2009; Locke et al., 2009b), вместо 10^{-6} - 10^{-8} , характерной для антибиотиков других классов, таких как фторхинолоны и рифампицин (Evans, Titlow, 1998; O'Neill et al., 2001).

Динамика развития устойчивости к линезолиду тщательно отслеживается путём проведения многоцентровых исследований. Ежегодная оценка эффективности и спектра действия оригинального препарата Зивокс® проводится в рамках международной программы ZAAPS (Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum), охватывающей 42 страны, в ряд которых не

входит США, и действующей в США программы LEADER (The Linezolid Experience and Accurate Determination of Resistance). Результаты обеих программ за последние несколько лет указывают на медленное развитие устойчивости к препарату: чувствительность стафилококков сохраняется на уровне 98,5-100%, а энтерококков – 99,3-100% (Pfaller et al., 2017; Mendes et al., 2018).

Вместе с тем, терапия линезолидом в клинике неоднократно приводила к развитию резистентности у энтерококков и у стафилококков, причём первые случаи были описаны вскоре после его внедрения в клиническую практику. Выделяли устойчивые штаммы *S. aureus* (Tsiodras et al., 2001; Wilson et al., 2003; Meка et al., 2004a, 2004b; Gales et al., 2006; Hentschke et al., 2007; Locke et al., 2009a; Yoshida et al., 2009; Hill et al., 2010; Ikeda-Dantsuji et al., 2011), *E. faecium* (Johnson et al., 2002; Auckland et al., 2002; Halle et al., 2004; Swoboda et al., 2005; Seedat et al., 2006; Knoll et al., 2013; de Almeida et al., 2014), *E. faecalis* (Johnson et al., 2002; Auckland et al., 2002; Burleson et al., 2004; Halle et al., 2004; Dibo et al., 2004; de Almeida et al., 2014; Yu et al., 2014), *S. epidermidis* (Liakopoulos et al., 2009; Lincopan et al., 2009; Ishiwada et al., 2016). Как правило, резистентность к линезолиду развивалась вследствие длительной терапии, чаще всего при монотерапии оксазолидиноном.

К настоящему времени обнаружен ряд хромосомных мутаций, обуславливающих устойчивость энтерококков и стафилококков к линезолиду. Чаще всего происходят замены в V домене участка гена 23S рРНК (нумерация по *E. coli*), наиболее распространенные из них: G2576Т, G2447Т, G2474Т (Cidral et al., 2015, Gu et al., 2013, Bender et al., 2015, Gu et al., 2013, de Almeida et al., 2014; Yu et al., 2014, Gu et al., 2013, Gu et al., 2013, Gu et al., 2013; Ishiwada et al., 2016, Gu et al., 2013; Cidral et al., 2015, Ishiwada et al., 2016, Gu et al., 2013, Bender et al., 2015). Также встречаются мутации в генах *rplC*, *rplD* и *rplV*, кодирующих 50S рибосомальные белки L3, L4 и L22, соответственно (Locke et al., 2009a, 2009b; Mendes et al., 2014; Bender et al., 2015; Kosecka-Strojek et al., 2020). На сегодняшний день хромосомные мутации – наиболее

распространённый механизм развития устойчивости бактерий к линезолиду. При хромосомных мутациях устойчивость бактерий к оксазолидинону увеличивается постепенно, по мере их накопления. Снижение чувствительности возбудителей к линезолиду в результате терапии свидетельствует о том, что его клинический режим дозирования может быть не оптимален в отношении ряда штаммов бактерий.

Вместе с тем, устойчивость к линезолиду может развиваться и вследствие горизонтального трансфера генов, при получении бактериями плазмид с *cfr*-генами, кодирующими рибосомальные метилтрансферазы (Morales et al., 2010; Bonilla et al., 2010; Gu et al., 2013; Bender et al., 2015; Kosecka-Strojek et al., 2020), *optrA*- или *poxtA*-генами, кодирующими АВС-транспортёры антибиотиков (Gawryszewska et al., 2017; Lazaris et al., 2017; Antonelli et al., 2018).

1.5.2 Даптомицин

Даптомицин – антибиотик из класса липопептидов, продуцируемый почвенным актиномицетом *Streptomyces roseosporus*. Даптомицин представляет собой циклический липопептид, в состав которого входят 13 аминокислот и декановая кислота, образующие гидрофильное ядро и липофильный хвост (Рисунок 18). Даптомицин – бактерицидный антибиотик, обладает активностью в отношении грамположительных бактерий. Антибиотик характеризуется специфическим механизмом действия: липидный хвост молекулы даптомицина в присутствии ионов кальция связывается с клеточной мембраной бактерии, нарушая её целостность. Отток ионов калия, натрия и магния через образовавшиеся небольшие поры приводит к деполяризации мембраны (Silverman et al., 2003; Zhang et al., 2014). В последствии истощаются запасы АТФ, нарушается синтез белка и нуклеиновых кислот, что приводит к гибели клетки (Hobbs et al, 2008; Taylor, Palmer, 2016).

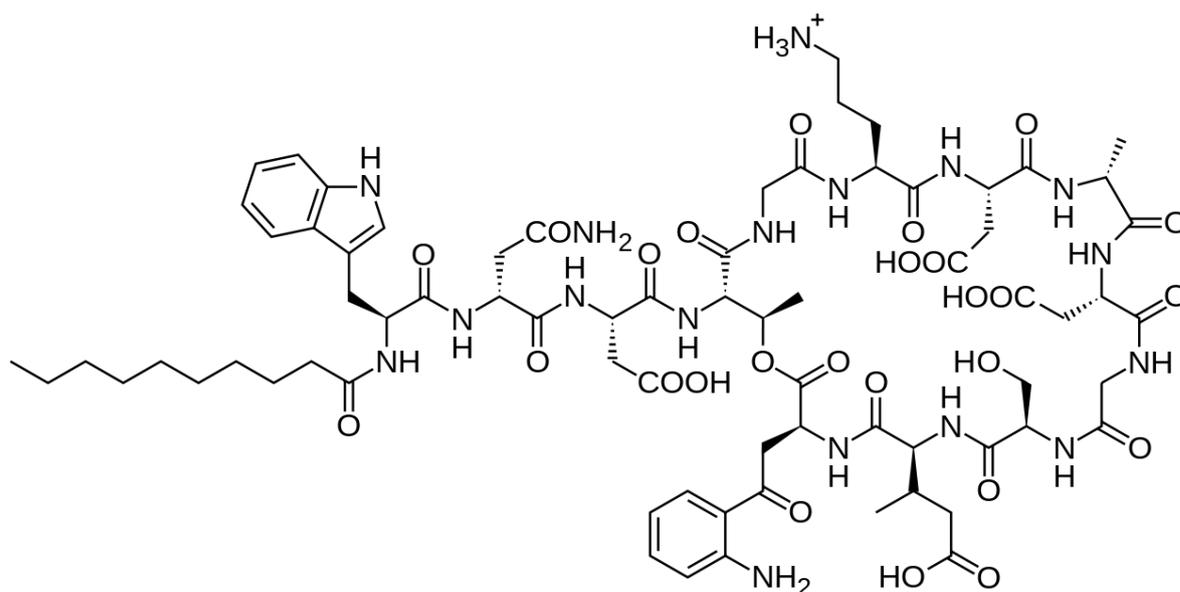


Рисунок 18. Химическая структура даптомицина. N-Деканоил-L-триптофил-L-аспарагинил-L-аспартил-L-треонилглицил-L-орнитил-L-аспартил-D-аланил-L-аспартилглицил-D-серил-трео-3-метил-L-глутамил-3-антранилоил-L-аланин[εγr]1-лактон.

Даптомицин высокоактивен в отношении большинства грамположительных бактерий и оказывает бактерицидное действие. Среди чувствительных патогенов – устойчивые к ванкомицину энтерококки, устойчивые и чувствительные к метициллину *S. aureus*, устойчивые к пенициллину *Streptococcus pneumoniae* (Cubicin (daptomycin for injection). URL: <https://www.cubicin.com/>). Штаммы *Staphylococcus* spp. и *Streptococcus* spp. подразделяют на чувствительные (МПК ≤ 1) и нечувствительные (МПК ≥ 1) к даптомицину. Пороги чувствительности и резистентности энтерококков для данного препарата не установлены (Turnidge et al., 2020). Типичные значения МПК₅₀ и МПК₉₀ даптомицина составляют, соответственно, 0,25 и 0,5 мкг/мл в отношении стафилококков, $\leq 0,06$ и 0,25 мкг/мл в отношении β -гемолитических стрептококков, 1 и 2 мкг/мл в отношении энтерококков (Sader et al., 2014; Pfaller et al., 2017; Mendes et al., 2018).

Даптомицин одобрен к клиническому применению с 2003 г, оригинальный лекарственный препарат – Кубицин (Cubicin). Даптомицин показан к применению для терапии сложных инфекций кожи и мягких тканей

в дозе 4 мг/мг, а также бактериемии и правостороннего эндокардита, вызванных чувствительными и устойчивыми к метициллину штаммами *S. aureus*, в дозе 6 мг/мг (Cubicin (daptomycin for injection). URL: <https://www.cubicin.com/>). Поскольку была установлена хорошая переносимость даптомицина в дозах до 12 мг/кг включительно (Benvenuto et al., 2006), его нередко назначают в дозах 8, 10 или 12 мг/кг каждые 24-48 ч (Wu et al., 2011; Kullar et al., 2011; Casapao et al., 2013; Gould et al., 2013). Антибиотик применяют внутривенно, продолжительность инфузии препарата составляет 30 минут. Стандартные режимы дозирования составляют 4 и 6 мг/кг один раз в сутки в течение 1-6 недель в зависимости от инфекционного заболевания и тяжести его течения. Максимальная концентрация даптомицина в плазме крови составляет в среднем 58 и 99 мкг/мл при режиме дозирования 4 и 6 мг/кг, соответственно (Dvorchik et al., 2003). Соответствующие величины ПФК даптомицина приблизительно равны 494 и 747 мкг×ч/мл. Период полувыведения препарата составляет около 9 ч. Даптомицин обратимо связывается с белками плазмы человека на 90-93% независимо от концентрации. Липопептид плохо проходит через гематоэнцефалический барьер (Cottagnoud et al., 2004; Gerber et al., 2006; Riser et al., 2010; Le et al., 2010).

Неоднократно сообщалось о потере чувствительности возбудителей инфекционных заболеваний к даптомицину в результате терапии липопептидом. Как и в случае с линезолидом, развитие устойчивости к липопептиду начали отмечать вскоре после начала применения препарата в клинике (Vikram et al., 2005; Lewis II et al., 2005; Munoz-Price et al., 2005). Выделяли нечувствительные к даптомицину штаммы *S. aureus* (Vikram et al., 2005; Hsu et al., 2010; Lee et al., 2010; Boyle-Vavra et al., 2011; Jongsma et al., 2013), *E. faecium* (Lewis II et al., 2005; Kelesidis et al., 2013; Matono et al., 2016), *E. faecalis* (Munoz-Price et al., 2005; Kanafani et al., 2007; Hidron et al., 2008). В ряде случаев резистентность к даптомицину развивалась и при применении антибиотика в высоких дозах (до 12 мкг/кг каждые 24 ч) (Hirschwerk et al.,

2006; Lee et al., 2010; Jongsma et al., 2013; Matono et al., 2016). Точные механизмы развития устойчивости бактерий к даптомицину пока неясны. Отмечен ряд мутаций в генах бактерий, функционально связанных с клеточной мембраной и клеточной стенкой, которые приводили к снижению чувствительности к даптомицину (Julian et al., 2007; Tran et al., 2015; Stefani et al., 2015; Taylor, Palmer, 2016).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Питательные среды, вспомогательное оборудование, расходные материалы и антибиотики

При проведении экспериментов использовали жидкую питательную среду – бульон Мюллера-Хинтон (МХБ) (Becton-Dickinson & Co., США), и плотную питательную среду – агар Мюллера-Хинтон II (МХА II) (Becton-Dickinson & Co., США). Состав МХБ (г/л): кислотный гидролизат казеина – 17,5, экстракт говядины – 3, крахмал – 1,5. Состав МХА II (г/л): кислотный гидролизат казеина – 17,5, экстракт говядины – 2, крахмал – 1,5, агар-агар – 17. Питательные среды готовили путём растворения сухой субстанции в дистиллированной воде (22 г МХБ и 38 г МХА II на 1 л, соответственно) и стерилизовали автоклавированием при 121°C и 2 атм. в течение 20 мин.

В работе использовали вспомогательное оборудование и расходные материалы:

Бюретка без крана, 1-3-2-25-0,1 (25 мл) (МиниМедПром, Россия);

Дозатор механический многоканальный варьруемого объёма GILSON Pipetman Ultra, 20-300 мкл (Gilson, Франция);

Дозаторы механические одноканальные варьруемого объёма ВЮНИТ mLINE, 20-200 мкл, 100-1000 мкл и 500-5000 мкл (Sartorius, Германия);

Петли микробиологические однократного применения, стерильные, 1 мкл (Deltalab, Испания);

Пипетки серологические однократного применения, стерильные, объём 2, 5, 10 и 25 мл (Corning Incorporated, США);

Планшеты для микротирования однократного применения, стерильные, с крышкой, на 48 лунок круглодонной “U-формы”.

Пробирки однократного применения с завинчивающейся крышкой, стерильные, 10 мл (Nuova Aptaca, Италия);

Пробирки однократного применения центрифужные конические с завинчивающейся крышкой, стерильные, 50 мл (Deltalab, Испания);

Флаконы градуированные, НС, 250, 500, 1000 и 5000 мл (Simax, Чехия);

Цилиндры и стаканы мерные из стекла и полимеров;

Чашки Петри 90×15 вентилируемые, односекционные, однократного применения, стерильные (Пластилаб, Россия);

Шпатели стеклянные L-формы (МиниМедПром, Россия).

Линезолид был предоставлен компанией Pfizer Corporation (Гротон, США), даптомицин – компанией Cubist Pharmaceuticals, Inc. (Лексингтон, США). Для приготовления исходного раствора линезолида и даптомицина концентрации 1000 мкг/мл к навеске каждого антибиотика с учётом его активности (999,9 и 937 мкг/мг, соответственно) добавляли стерильную дистиллированную воду и перемешивали до полного растворения. Поскольку антибактериальная активность даптомицина в значительной степени обусловлена присутствием ионов Ca^{2+} , их концентрацию, соответствующую физиологическому значению в крови человека (50 мг/л (Hanberger et al., 1991; Carpenter, Chambers, 2004)), создавали в питательных средах, используемых во всех исследованиях с данным антибиотиком. Среда обогащалась дополнительными катионами кальция в соответствии с инструкцией, предоставленной Cubist Pharmaceuticals, Inc.

Количественное определение ионов Ca^{2+} до и после обогащения проводилось методом комплексонометрического титрования согласно ПНД Ф 14.1:2:3.95-97 (Издание 2016 г). МХА II титровали до автоклавирования, после отделения среды от осаждённого центрифугированием агар-агара. Результаты типичного измерения приведены на Рисунке 19. При проведении всех экспериментов отклонение от целевой концентрации Ca^{2+} в средах (50 мг/л), не превышало 4 мг/л.

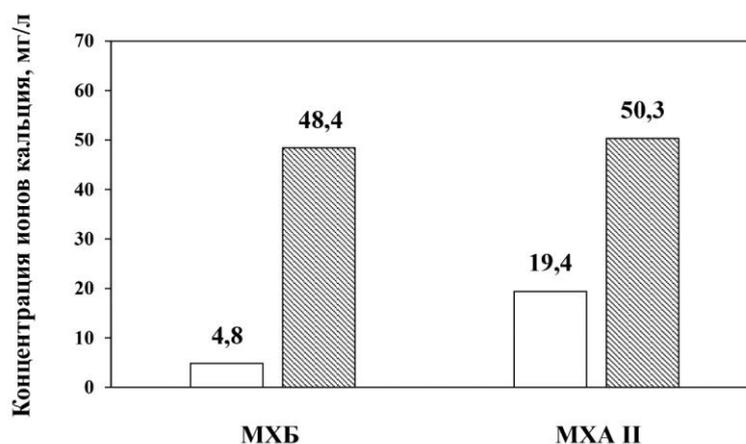


Рисунок 19. Концентрация ионов кальция в питательных средах до (белые столбцы) и после обогачивания (заштрихованные столбцы).

2.2 Бактериальные штаммы

В работе использовали 4 штамма *Staphylococcus aureus* – 3 клинических изолята (479, 688, 2061) и 1 коллекционный штамм (ATCC 700699 (GISA Mu-50)). Поддержание бактериальных культур обеспечивали путём их периодического посева на МХА II.

Все штаммы были устойчивыми к метициллину (MRSA). Штамм *S. aureus* ATCC 700699 характеризовался сниженной чувствительностью к ванкомицину, клинические изоляты были чувствительны к ванкомицину. Характеристика коллекционного штамма *S. aureus* ATCC 700699 доступна по адресу: <https://www.atcc.org/products/700699> (дата обращения 25.05.2021).

В качестве объектов исследования при изучении процессов развития устойчивости *S. aureus* к линезолиду были выбраны 3 штамма: *S. aureus* 479, *S. aureus* 688 и *S. aureus* ATCC 700699. В качестве объекта для изучения в динамической системе также рассматривался штамм *S. aureus* 2061, но значения МПК и МПК_М линезолида (2 и 10 мкг/мл, соответственно) в его случае совпадали с таковыми для *S. aureus* ATCC 700699, и для исследования был выбран коллекционный штамм. Включение в работу именно *S. aureus* ATCC 700699 было признано более актуальным, поскольку он характеризуется сниженной чувствительностью к ванкомицину, а применение

линезолида показано при инфекциях, вызванных резистентными к ванкомицину штаммами золотистого стафилококка (ZYVOX (linezolid). Pfizer medical information. URL: <https://www.pfizermedicalinformation.com/en-us/zyvox?section=indications-usage>). Исследования «антимутантного» эффекта линезолида в комбинации с даптомицином проводили со штаммами *S. aureus* 2061 и *S. aureus* ATCC 700699.

В экспериментах с линезолидом и *S. aureus* (определение МПК_М и исследования в динамической системе) использовали инокулят *S. aureus*, обогащённый устойчивыми к антибиотику мутантами, в соответствии с рекомендациями по изучению процессов развития резистентности бактерий, характеризующихся низкой частотой мутаций (Firsov et al., 2015b). Резистентных мутантов (resistant mutants, РМ) получали путём многократных пересевов на среде с линезолидом, содержание которого постепенно повышали от 1 до 64 мкг/мл. Каждый пассаж включал посев на жидкую и твердую среду. Сначала суспензию бактериальных клеток добавляли в ряд пробирок с МХБ с возрастающими концентрациями антибиотика. После инкубации в течение 24 ч из пробирки с наибольшей концентрацией линезолида, при которой наблюдался видимый рост колоний (мутность бульона $\geq 0,3$ по стандарту МакФарланда) делали высеv на МХА II с антибиотиком в той же концентрации. Плотность популяции измеряли на денситометре Densi-La-Meter II (Erba Lachema, Чехия) Выросшие после 48-часовой инкубации колонии использовали для следующего пассажа. Таким образом, на первом этапе стимулировали приобретение стафилококком устойчивости к линезолиду, а на втором – фиксировали её и проверяли чистоту бактериальной суспензии. Пассажи не прекращали до получения клеток с величиной МПК линезолида, равной 8 мкг/мл, так как ранее было установлено, что добавление мутантов с таким уровнем устойчивости к основной популяции в соотношении, воспроизводящем частоту мутаций 10^{-8} , практически не изменяет значение МПК_М линезолида (Firsov et al., 2015b).

Стабильность приобретённой устойчивости проверяли после 20 пересевов РМ на МХА II без антибиотика.

Анализ нуклеотидных последовательностей V домена 23S рРНК родительских штаммов *S. aureus* 479, *S. aureus* 688, *S. aureus* 2061 и *S. aureus* ATCC 700699 и их резистентных мутантов проводили путём амплификации с помощью ПЦР и прямого секвенирования индивидуальных копий оперонов рРНК согласно описанной ранее методике (Eliopoulos et al., 2004; Firsov et al., 2015b)¹. На основании данных компьютерного анализа генома *S. aureus* ATCC 700699, для амплификации соответствующих копий генов рРНК использовали две дополнительные комбинации праймеров: V-domF - rrn2(5)R и V-domR - rrn3R.

2.3 Оценка чувствительности *S. aureus* к антибиотикам. Определение МПК и МПК_М

Значения МПК антибиотиков устанавливали методом серийных разведений в бульоне Мюллера-Хинтон, содержащем 24-часовую культуру бактерий с исходной численностью клеток, равной 5×10^5 КОЕ/мл (Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Sixth Edition. Approved Standard M-7-A6. Wane, США).

Значения МПК_М оценивали по методике, разработанной X. Zhao и K. Drlica (Zhao, Drlica, 2001). Клетки *S. aureus* инкубировали в МХБ при температуре 37°C в течение 24 ч. Полученную культуру центрифугировали (при 4000×g в течение 10 мин) и разбавляли свежим бульоном для достижения численности клеток, равной приблизительно 10^{11} КОЕ в 1 мл. При

¹ Генетические исследования проведены под руководством М. В. Эдельштейна и при непосредственном участии А. В. Романова – сотрудников Научно-исследовательского института антимикробной терапии Смоленской государственной медицинской академии.

определении значений МПК_М линезолида в отношении *S. aureus*, в том числе в присутствии даптомицина, использовали смешанный инокулят: к 0,9 мл 10^{11} КОЕ/мл суспензии стафилококков добавляли 0,1 мл 10^4 КОЕ/мл суспензии их РМ (воспроизводимая частота мутаций 10^{-8}). Пробы объёмом 100 мкл последовательно разводили стерильной дистиллированной водой и затем высевали на чашки Петри с МХА II, содержащим известные концентрации линезолида (и/или даптомицина в случае *S. aureus* 2061 и *S. aureus* ATCC 700699). Диапазон концентраций антибиотиков был следующим: от 0,5 до 32 мкг/мл линезолида и от 0,25 до 64 мкг/мл даптомицина. Засеянные чашки инкубировали до 72 ч при температуре 37°C и подсчитывали число колоний. За МПК_М принимали минимальную концентрацию антибиотика, которая обеспечивала подавление роста мутантов. Теоретический нижний предел определения численности клеток составлял 10 КОЕ/мл (\lg КОЕ/мл = 1).

Значения МПК и МПК_М линезолида и даптомицина в присутствии друг друга в отношении штаммов *S. aureus* 2061 и *S. aureus* ATCC 700699 МПК и МПК_М определяли по соответствующей вышеописанной методике при соотношении их концентраций 1:2 в МХБ и МХА II, соответственно. Такое же соотношение ПФК данных антибиотиков затем моделировали в экспериментах в динамической системе *in vitro*. Диапазон концентраций сочетаемых антибиотиков при определении МПК_М составил от 0,5 до 14 (линезолид) и с 1 до 28 мкг/мл (даптомицин).

2.4 Моделируемые фармакокинетические профили антибиотиков

Во всех случаях моделировали моноэкспоненциальные фармакокинетические профили антибиотиков со значениями периода полувыведения, установленными при клиническом изучении фармакокинетики линезолида (Moellering, 1999; Stalker, Jungbluth, 2003) и даптомицина (Dvorchik et al., 2003). Моделируемые в динамической системе *in vitro* значения $T_{1/2}$ составляли 6 и 9 ч, соответственно. Воспроизведённые

фармакокинетические профили соответствовали реализуемым у человека при 5-дневном введении линезолида с интервалом в 12 ч (10 введений) и 5-дневном введении даптомицина с интервалом в 24 ч (5 введений).

С целью изучения фармакодинамики линезолида, в частности зависимости селекции устойчивых мутантов от параметров ПФК/МПК, ПФК/МПК_М, $T_{ОСМ}$, $T_{>МПКМ}$ и ПОМПК_М, моделируемые отношения ПФК/МПК варьировали в 32-кратных пределах для всех штаммов *S. aureus*, (Таблица 3). Режимы дозирования линезолида обозначены буквой “Л”, а значения ПФК (в мкг×ч/мл) – цифрами. Как следует из таблиц, моделируемые фармакокинетические профили обеспечивали широкий диапазон изменений $T_{ОСМ}$ – от 0 до 100% интервала дозирования. Значения ПФК линезолида включали величину 240 мкг×ч/мл, близкую к клинически реализуемой (ПФК ≈ 228 мкг×ч/мл) при введении антибиотика в дозе 600 мг каждые 12 ч (Meagher et al., 2003), далее – клинически реализуемое значение).

Таблица 2. Моделируемая фармакокинетика линезолида и его фармакокинетико-фармакодинамические параметры в отношении *S. aureus*. Эксперименты описаны в Главе 3.

Бактериальный штамм	Режим дозирования	C_0	ПФК/МПК	ПФК/МПК _М	$T_{ОСМ}$	$T_{>МПКМ}$
		мкг/мл	ч		% от интервала дозирования	
<i>S. aureus</i> 479	Л15	0,9	7,5	3	0	0
	Л30	1,8	15	6	10	0
	Л60	3,6	30	12	59	0
	Л120	7,2	60	24	52	47
	Л240	14,4	120	48	6	94
	Л480	28,8	240	96	0	100
<i>S. aureus</i> 688	Л15	0,9	7,5	3	0	0
	Л30	1,8	15	5	10	0
	Л60	3,6	30	10	59	0
	Л120	7,2	60	20	65	34
	Л240	14,4	120	40	16	84
	Л480	28,8	240	80	0	100

<i>S. aureus</i> АТСС 700699	Л15	0,9	7,5	2	0	0
	Л30	1,8	15	3	10	0
	Л60	3,6	30	6	59	0
	Л120	7,2	60	12	99	0
	Л240	14,4	120	24	53	47
	Л480	28,8	240	48	4	96

Кинетика изменения численности клеток еще одного клинического штамма *S. aureus* – *S. aureus* 2061 была изучена при моделировании режима Л120. Соответствующие значения C_0 , ПФК/МПК и ПФК/МПК_м, $T_{ОСМ}$ и $T_{>МПКм}$ составляли 7,2 мкг/мл, 60 и 12 ч, 99 и 0% от интервала дозирования.

При изучении фармакодинамики и «антимутантного» эффекта комбинации линезолида с даптомицином в отношении *S. aureus* 2061 и *S. aureus* АТСС 700699 моделировали профили антибиотиков с клинически реализуемым или субклиническим (уменьшенным в 2 раза) значением ПФК, в отдельности (Таблица 3) или в комбинации (Таблица 5). Режимы дозирования линезолида и даптомицина обозначены буквой “Л” и “Д”, соответственно, а значения ПФК (в мкг×ч/мл) – цифрами. Для даптомицина клинически реализуемое значение ПФК в отношении штаммов *S. aureus* 2061 и *S. aureus* АТСС 700699 составило 480 мкг×ч/мл (близко к ПФК = 494 мкг×ч/мл при введении антибиотика в дозе 4 мг/кг каждые 24 ч (Dvorchik et al., 2003))

Таблица 3. Моделируемая фармакокинетика линезолида и даптомицина и их фармакокинетико-фармакодинамические параметры в отношении *S. aureus*. Эксперименты описаны в Главе 4.

Бактериальный штамм	Антибиотик							
	Режим дозирования	Линезолид			Даптомицин			
		C_0	$T_{ОСМ}$	$T_{>МПКм}$	Режим дозирования	C_0	$T_{ОСМ}$	$T_{>МПКм}$
		мкг/мл	% от интервала дозирования			мкг/мл	% от интервала дозирования	
<i>S. aureus</i> 2061	Л240	14,4	53	47	Д480	38,4	18	82
	Л120	7,2	99	0	Д240	19,2	56	44

<i>S. aureus</i> АТСС 700699	Л240	14,4	53	47	Д480	38,4	35	65
	Л120	7,2	99	0	Д240	19,2	73	27

Таблица 4. Моделируемая фармакокинетика линезолида (Л) и даптомицина (Д) при их комбинированном введении и соответствующие фармакокинетико-фармакодинамические параметры в отношении *S. aureus*. Эксперименты описаны в Главе 4.

Бактериальный штамм	Режим дозирования	C_0 (Л) + C_0 (Д)	T_{OSM} (Л)	T_{OSM} (Д)	$T_{>МПКМ}$ (Л)	$T_{>МПКМ}$ (Д)
		мкг/мл	% от интервала дозирования			
<i>S. aureus</i> 2061	Л240+Д480	14,4+38,4	3	6	97	94
	Л120+Д240	7,2+19,2	37	43	63	57
<i>S. aureus</i> АТСС 700699	Л240+Д480	14,4+38,4	0	0	100	100
	Л120+Д240	7,2+19,2	16	27	84	73

2.5 Динамическая система *in vitro*

2.5.1 Динамическая система для воспроизведения фармакокинетического профиля антибиотика

С целью моделирования фармакокинетических профилей антибиотиков и изучения их фармакодинамики использовали динамическую систему *in vitro*, описанную ранее (Firsov et al., 2015b). Она состоит из герметичных сосудов (камер) различного назначения, насосов для создания потоков жидкостей между всеми компонентами и системы отбора проб (Рисунок 20). В центральную камеру (ЦК) с суспензией бактерий периодически струйно вводится раствор антибиотика (шприцевой насос Gilson 402 (Франция)). Перистальтические насосы Cole Palmer (США) и Gilson minipuls 3 (Франция) обеспечивают постоянный приток свежей питательной среды в ЦК и отток содержимого из неё с одинаковой объёмной скоростью F . Она рассчитывается по формуле (15) (Фирсов и соавт., 1989)

$$F = V \times \ln 2 / T_{1/2}, \quad (15)$$

где V – суммарный объём содержимого центральной камеры и шлангов системы отбора проб, а $T_{1/2}$ – период полувыведения изучаемого антибиотика.

Таким образом обеспечивается постоянство объёма среды в центральной камере динамической системы. Объём используемой во всех экспериментах центральной камеры был равен 110 мл (исходный объём в 100 мл, скорректированный добавлением объёма шлангов системы отбора проб, равного 10 мл). Объёмная скорость потока составляла 12,7 мл/ч в опытах с линезолидом ($T_{1/2} = 6$ ч) и 8,5 мл/ч в опытах с даптомицином ($T_{1/2} = 9$ ч).

Центральная камера термостатируется (термостат Binder BF 53 (Германия) при температуре 37°C. Постоянное перемешивание (магнитная мешалка ELMi MS01 (Латвия)) обеспечивает равномерное распределение в бульоне клеток бактерий и молекул антибиотика. Раствор антибиотика и пробы до обработки хранятся при 6°C.

Введение антибиотика в динамическую систему и отбор проб был автоматизирован. Количество и периодичность введений раствора антибиотика шприцевым насосом устанавливается в компьютерной программе Gilson SP402-MP3. Интервал времени между введениями равен интервалу дозирования препарата: 12 ч для линезолида и 24 ч для даптомицина. Объём вводимого раствора антибиотика (V_{AB}) рассчитывается с учетом объёма камеры и значения C_0 , соответствующего заданному значению ПФК.

$$V_{AB} = C_0 \times V / C_{AB}, \quad (16)$$

где C_0 – значение $C_{МАКС}$ после первого введения антибиотика, V – суммарный объём содержимого центральной камеры и шлангов системы отбора проб, а C_{AB} – концентрация вводимого раствора антибиотика.

Время включения и выключения клапанов системы отбора проб настраивается в компьютерной программе ZelioSoft2 v.4.2. Отбор проб для проведения популяционного анализа и проверки соответствия минимальной концентрации антибиотика заданному значению осуществляется непосредственно перед очередным введением антибиотика, а при проверке

соответствия максимальной концентрации антибиотика заданному значению – сразу после введения препарата.

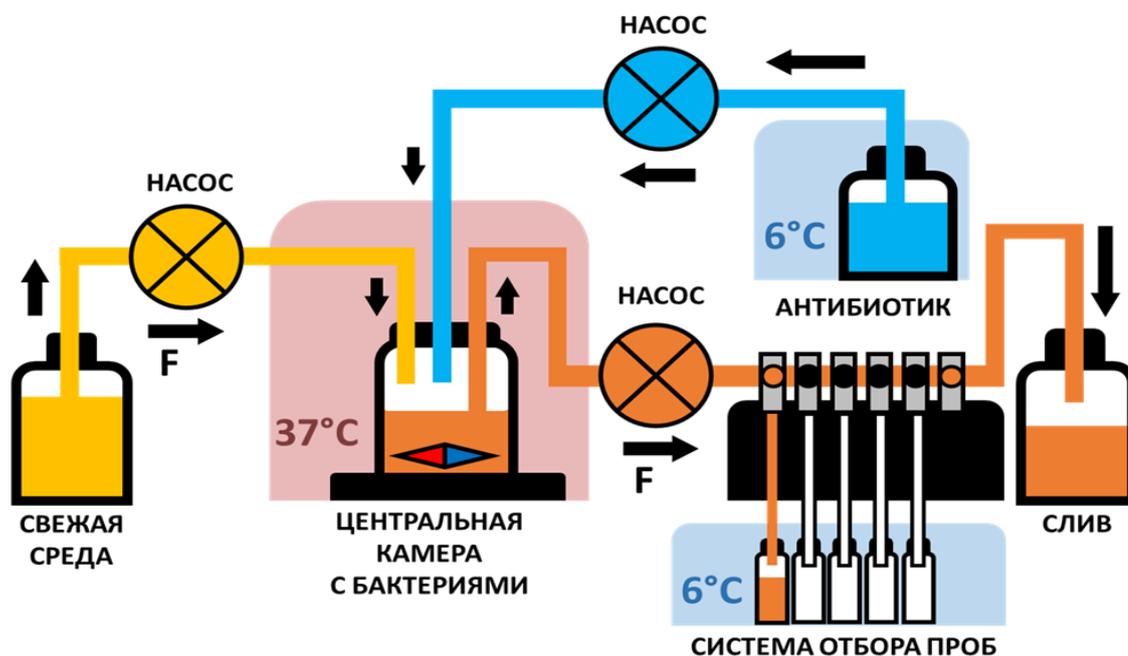


Рисунок 20. Схема динамической системы *in vitro*.

2.5.2 Динамическая система для одновременного воспроизведения фармакокинетических профилей двух антибиотиков

Линезолид и даптомицин характеризуются разными значениями $T_{1/2}$ (6 и 9 ч, соответственно), так что каждому антибиотику соответствует свое собственное значение F – 12,7 мл/ч ($F_{\text{л}}$, линезолид) и 8,5 мл/ч ($F_{\text{д}}$, даптомицин). В подобных случаях для одновременного моделирования профилей двух препаратов используется принцип суперпозиции потоков (Blaser, 1985). К системе присоединяют дополнительную камеру со свежей средой, в которой создается такая же концентрация антибиотика с большим $T_{1/2}$, как в центральной камере (Рисунок 21). “Подпитывание” раствором антибиотика из дополнительной камеры позволяет поддерживать нужную его концентрацию в центральной камере. Таким образом удаётся сохранить соотношение концентраций препаратов в динамической системе при их комбинированном применении.

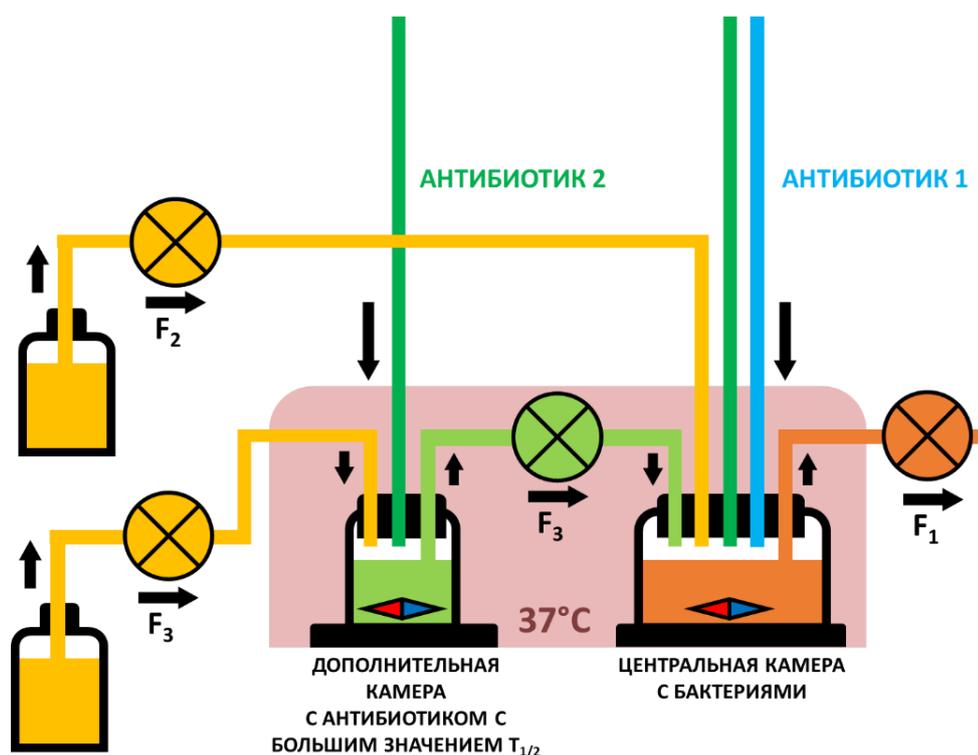


Рисунок 21. Схема динамической системы *in vitro* для одновременного воспроизведения фармакокинетических профилей двух антибиотиков. $F_1 = F_{\text{лин}}$, $F_2 = F_{\text{л}}$, $F_3 = F_{\text{л}} - F_{\text{д}}$.

Дополнительную камеру заполняли раствором даптомицина в МХБ. Свежий бульон подавался в ДК с объёмной скоростью $F_{\text{л}} - F_{\text{д}}$ (4,2 мл/ч), и с той же скоростью среда с даптомицином переносилась из ДК в ЦК. Одновременный приток стерильного МХБ в ЦК шёл со скоростью $F_{\text{д}}$ (8,5 мл/ч). При этом суммарная скорость элиминации содержимого ЦК соответствовала скорости элиминации линезолида (12,7 мл/ч). Объём дополнительной камеры ($V_{\text{ДК}}$) рассчитывали по формуле (17) (Blaser, 1985)

$$V_{\text{ДК}} = ((F_{\text{л}} - F_{\text{д}})/F_{\text{д}}) \times V, \quad (17)$$

где $F_{\text{л}}$ – объёмная скорость для линезолида, $F_{\text{д}}$ – объёмная скорость для даптомицина, V – суммарный объём содержимого центральной камеры и шлангов системы отбора проб,

При значении V , равном 110 мл, объём ДК составил 54 мл.

2.6 Воспроизводимость фармакокинетических профилей линезолида и даптомицина

С целью оценки воспроизводимости заданных фармакокинетических профилей антибиотика из ЦК отбирались пробы за 5 мин до (минимальная концентрация) и через 5 мин после его введения (максимальная концентрация). Отбор проводился на 4 и 5 сутки после начала моделируемой терапии, при равновесном состоянии профиля антибиотика (“steady-state”). Пробы объемом 300 мкл помещали в пластиковые пробирки типа «Эппендорф», прибавляли по 300 мкл метанола, встряхивали в течение 1 мин, центрифугировали в течение 5 мин при 13 000 об/мин. Супернатант анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)². В качестве контрольного раствора использовали стерильный МХБ, который подвергали идентичной пробоподготовке.

Изократическое разделение проводили при 50° С на колонке Luna C18 (2) (250 мм × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм; Phenomenex, США). Объем образца составлял 10 мкл. Подвижная фаза состояла из 40 мМ раствора фосфата аммония (рН 4,0) и ацетонитрила (объемное соотношение 3:2) при скорости подачи ПФ 1,2 мл/мин, обеспечиваемой насосом Gilson 305. Детектирование осуществляли при помощи УФ- детектора при 251 нм (линезолид) и 214 нм (даптомицин) (Waters 2489, Waters Associates, Milford, MA, USA). Градуировочные графики были линейными ($r^2 \geq 0,99$) в диапазоне концентраций линезолида и даптомицина в диапазоне 2-50 мкг/мл. Относительные стандартные отклонения (n = 5) для концентраций линезолида и даптомицина 50,0, 5,0, 1,0 и 0,2 мкг/мл составили 0,7, 0,9, 1,1, 1,6 и 0,9, 1,3, 2,0, 2,3% соответственно. Нижний предел количественного определения линезолида и даптомицина составлял 0,1 мг/л.

² Анализ концентрации антибиотиков методом ВЭЖХ проведен С. А. Довженко и М. Б. Кобриным – сотрудниками лаборатории фармакокинетики и фармакодинамики ФГБНУ «НИИНА».

Примеры соответствия установленных концентраций линезолида моделируемым значениям изображены на Рисунке 22. Как видно на рисунке, фактическое содержание линезолида в пробах практически совпадало с расчетным. В других случаях также не наблюдалось значительных отклонений от теоретических значений. Фактические значения периода полувыведения линезолида при моделируемой моно- (в среднем 6,3 ч; Глава 3) и комбинированной терапии (в среднем 6,1 ч; Глава 4) были близки к заданному (6 ч).

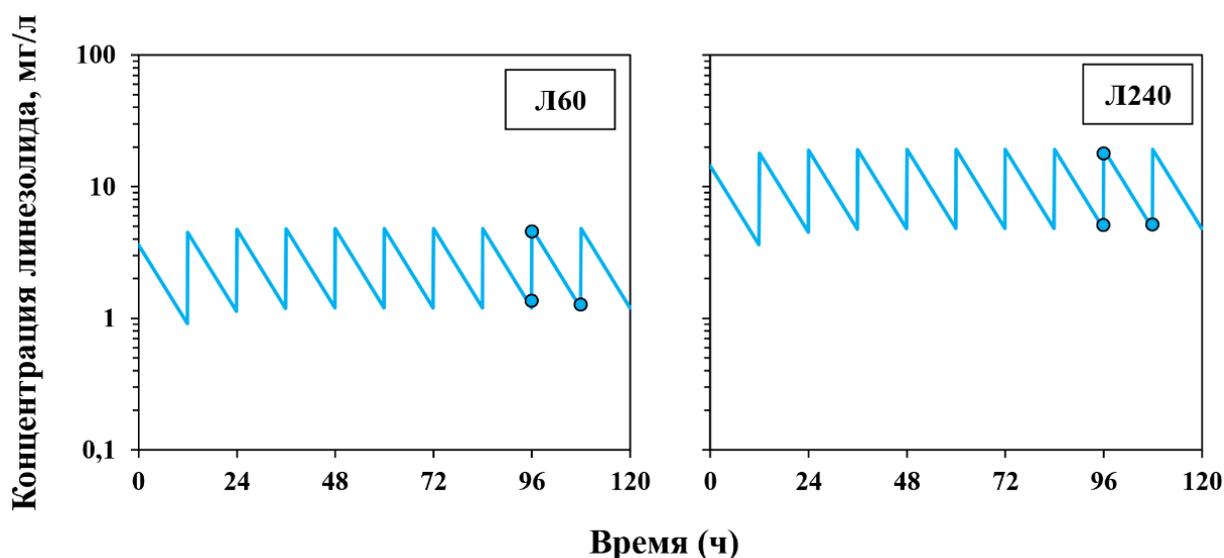


Рисунок 22. Моделируемые профили линезолида (сплошные линии) и фактические значения его концентрации (точки).

Связывание даптомицина с белками клеточных мембран бактерий (Boaretti, Sanerari, 1995) приводило к искажению результатов измерения его концентрации в пробах, отобранных при проведении экспериментов, в частности, при моделировании режимов Д240 и Л120+Д240. Так, фактические значения минимальной концентрации даптомицина могли составлять лишь 42-44% от теоретических значений. По этой причине воспроизводимость заданных фармакокинетических профилей даптомицина проверяли в среде без бактерий. Измеренные в данных условиях уровни его концентрации соответствовали теоретическим (примеры показаны на Рисунке 23). Фактические значения периода полувыведения даптомицина при

моделируемой моно- (в среднем 8,8 ч; Глава 4) и комбинированной терапии (в среднем 8,6 ч; Глава 4) были близки к заданному (9 ч).

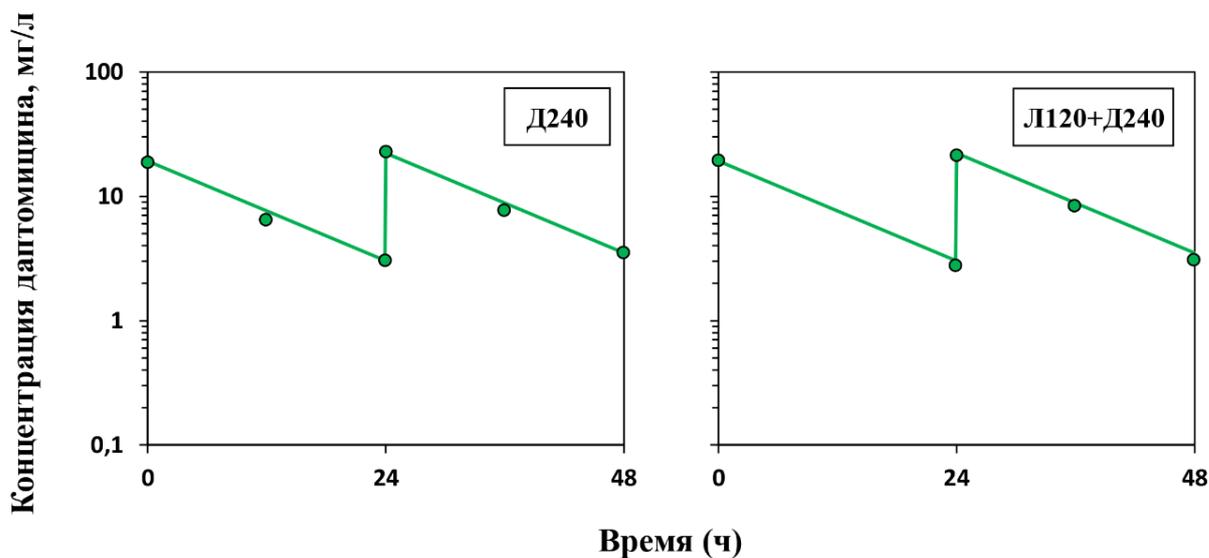


Рисунок 23. Моделируемые профили даптомицина (сплошные линии) и фактические значения его концентрации (точки).

2.7 Регламент эксперимента. Оценка противомикробного эффекта и развития устойчивости

Перед началом каждого эксперимента динамическую систему стерилизовали. ЦК заполняли МХБ с 18-часовой бактериальной культурой *S. aureus* и термостатировали при 37°C. Во всех экспериментах использовали смешанный инокулят: в ЦК с 10^8 КОЕ/мл стафилококков (10^{10} КОЕ на 100 мл) добавляли 1 мл суспензии, содержащей 10^2 РМ (частота мутаций 10^{-8} , соотношение количества устойчивых к линезолиду клеток к общей численности стафилококков 1:10⁸ КОЕ).

Фармакокинетику линезолида (Глава 3), даптомицина (Глава 4) или комбинации антибиотиков (Глава 4) воспроизводили, устанавливая поток или, в случае комбинации, несколько потоков среды с рассчитанной объёмной скоростью. Периодическое введение одного или двух антибиотиков начинали после инкубирования суспензии бактерий в течение ~2 ч и отбора нулевых проб. Длительность всех экспериментов составляла 120 ч. Все эксперименты проводились не менее чем в двух повторностях.

На протяжении каждого эксперимента из центральной камеры отбирали пробы объемом 100 мкл, которые последовательно разводили стерильной дистиллированной водой, а затем высевали на чашки Петри с МХА II. Чашки инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч, и затем подсчитывали число колоний. Нижний предел определения составлял 10^3 КОЕ/мл ($3 \lg$ КОЕ/мл).

С целью выявления устойчивых мутантов под воздействием антибиотиков и оценки интенсивности их роста проводили популяционный анализ путем посева проб каждые 24 ч на чашки с МХА II, содержащим антибиотик. Концентрации антибиотиков в агаре были следующими: 2×, 4× и 8×МПК (Глава 3); 2× и 4×МПК (Глава 4). Чашки инкубировали при температуре 37°C в течение 48 ч и затем подсчитывали число колоний. Нижний предел определения составлял 10 КОЕ/мл ($1 \lg$ КОЕ/мл). Для того, чтобы выявить возможные изменения чувствительности клеток после воздействия антибиотиков, определяли их МПК до, в течение и по окончании моделируемой терапии.

При интегральной оценке процессов изменения численности чувствительных и устойчивых бактериальных клеток под воздействием антибиотика использовали параметры ППК (площадь под кинетической кривой изменения общей численности клеток) (Фирсов и соавт., 1985) и ППК_М (площадь под кинетической кривой изменения численности антибиотикоустойчивых мутантов) (Firsov et al., 2008a), соответственно. Значения ППК и ППК_М оценивали в интервале времени от начала опыта до его окончания и корректировали, вычитая произведение численности клеток на уровне предела определения на 120 ч.

2.8 Анализ зависимости противомикробного эффекта и селекции устойчивых мутантов *S. aureus* от фармакодинамических параметров

В исследовании с линезолидом и *S. aureus* (Глава 3) определяли зависимость ППК_М от ПФК/МПК и от ПФК/МПК_М, которую описывали модифицированной функцией Гаусса

$$Y = Y_0 + a \exp(0,5(|x - x_0|/b)^c), \quad (18)$$

где Y – ППК_М, x – lg (ПФК/МПК) или lg (ПФК/МПК_М), Y_0 – минимальное значение Y , x_0 – значение lg (ПФК/МПК) или lg (ПФК/МПК_М), которое соответствует максимальному значению Y , a , b и c – параметры уравнения.

По результатам опытов с линезолидом и *S. aureus* (Глава 3) также определяли зависимость ППК_М от $T_{\text{ОСМ}}$ и от $T_{>\text{МПК}_\text{М}}$, ППК от ПФК/МПК, а по результатам опытов с линезолидом и даптомицином и *S. aureus* (Глава 4) – зависимость ППК_М от $T_{>\text{МПК}_\text{М}}$ и от ПОМПК_М.

Перечисленные зависимости описывали сигмоидной функцией

$$Y = Y_0 + a / \{1 + \exp(-(x - x_0)/b)\}, \quad (19)$$

Где Y – ППК_М или ППК, x – $T_{\text{ОСМ}}$, или $T_{>\text{МПК}_\text{М}}$, или lg (ПФК/МПК), или ПОМПК_М, Y_0 – минимальное значение ППК_М или ППК, a – максимальное значение ППК_М или ППК, x_0 – значение x , соответствующее $a/2$, и b – параметр уравнения, отражающий степень сигмоидности.

Все вычисления производили с помощью программного обеспечения SigmaPlot 12.

«Антимутантные» значения предикторов антибиотикорезистентности определяли на основании штаммонеспецифичных функциональных зависимостей (Уравнение (18) или Уравнение (19) в зависимости от параметра). За пороговое «антимутантное» значение принимали значение предиктора, соответствующее значению ППК_М, равному $30 \text{ (lg КОЕ/мл)} \times \text{ч}$ (Strukova et al., 2016b).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 3. ФАРМАКОДИНАМИКА ЛИНЕЗОЛИДА В ОТНОШЕНИИ УСТОЙЧИВЫХ И ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К НЕМУ КЛЕТОК *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Ранее Фирсовым А. А. и соавторами была установлена принципиальная возможность установления зависимостей между обогащением популяции стафилококков устойчивыми мутантами и концентрацией линезолида, но объектом данного исследования был единственный изолят *S. aureus*, что не позволило оценить инвариантность зависимости «резистентность – концентрация» относительно бактериального штамма, а также найти оптимальный предиктор селекции резистентных мутантов *S. aureus* (Firsov et al., 2015b). Для достижения этих целей описываемые в настоящей главе исследования фармакодинамики линезолида были проведены с четырьмя штаммами *S. aureus*, характеризующимися различными значениями МПК_М.

3.1 Лабораторная селекция устойчивых мутантов *S. aureus*

Ввиду низкой частоты мутаций *S. aureus* к линезолиду при изучении его фармакодинамики применительно к устойчивым мутантам использовали инокуляты, содержащие популяцию чувствительных клеток и устойчивых к линезолиду мутантов.

Развитие резистентности изученных штаммов *S. aureus* происходило с различной скоростью – быстрее у *S. aureus* 479 и *S. aureus* 2061, медленнее у *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 688. Эти различия иллюстрирует Рисунок 24, на котором показана динамика потери чувствительности клеток штаммов *S. aureus* 479 и *S. aureus* ATCC 700699. Как видно на рисунке, устойчивость *S. aureus* 479 развивалась, начиная с 5-го пассажа. После 7-го пассажа значение МПК линезолида в отношении данного штамма возросло до 8 мкг/мл. В

результате трёх последующих пересевов оно достигло 64 мкг/мл. Это значение не менялось вплоть до 12-го пассажа, после которого селекция мутантов *S. aureus* 479 была остановлена. В отличие от *S. aureus* 479, чувствительность *S. aureus* ATCC 700699 к линезолиду лишь после 13-го пассажа снизилась вдвое, а после 23-го – еще в 2 раза. Селекцию мутантов данного штамма прервали по достижении значения МПК линезолида, равного 32 мкг/мл. Как и для *S. aureus* 479, наблюдали резкое увеличение устойчивости *S. aureus* ATCC 700699 к линезолиду при последующих пересевах. Характер развития устойчивости штаммов *S. aureus* 2061 и *S. aureus* 688 к линезолиду был идентичным наблюдаемому у *S. aureus* 479 и *S. aureus* ATCC 700699, соответственно.

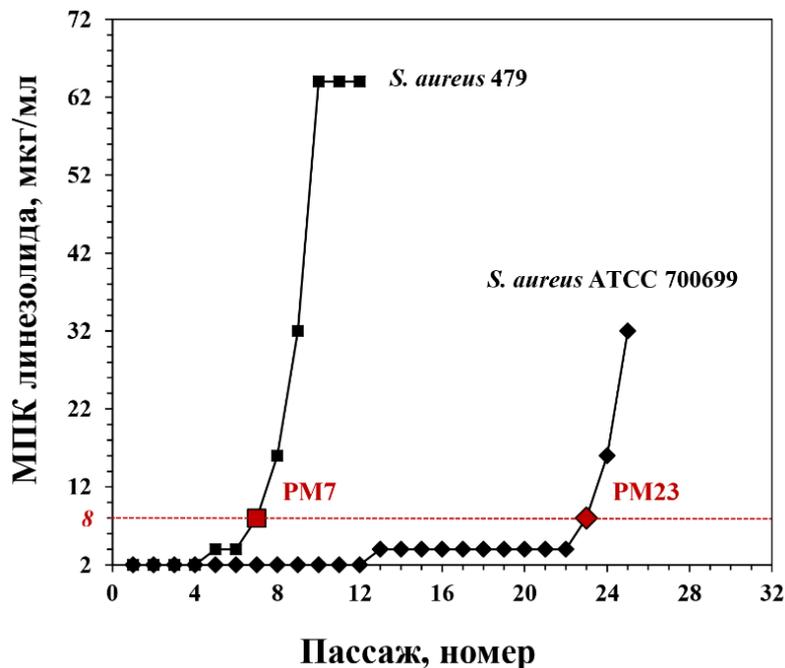


Рисунок 24. Потеря чувствительности штаммов *S. aureus* к линезолиду при последовательных пересевах на питательную среду, содержащую линезолид. Целевая величина МПК_М (8 мкг/мл) обозначена пунктирной линией.

Устойчивые к линезолиду мутанты каждого штамма с целевым значением МПК линезолида (8 мкг/мл) (Firsov et al., 2015b) были отобраны после 7-го (*S. aureus* 479, PM7), 9-го (*S. aureus* 2061, PM9), 23-го (*S. aureus* ATCC 700699, PM23) и 28-го (*S. aureus* 688, PM28) пассажа. Приобретённая устойчивость мутантов всех штаммов была стабильной: значение МПК

линезолида в отношении PM7, PM9, PM23 и PM28 оставалось равным 8 мкг/мл после 20 пассажей на среде без антибиотика. По результатам анализа нуклеотидных последовательностей участка V домена гена 23S рНК лабораторные мутанты *S. aureus* 479 (PM7) и *S. aureus* ATCC 700699 (PM23) содержали нуклеотидную замену G2576T (нумерация по *E. coli*) в одной из копий гена 23S рНК. Данная хромосомная мутация является классической мутацией, обуславливающей устойчивость к линезолиду у грамположительных микроорганизмов, и часто обнаруживается у выделенных в клинике стафилококков, устойчивых к линезолиду. У штамма *S. aureus* 688 по результатам генетического анализа участка V домена гена 23S рНК не было обнаружено известных мутаций, обуславливающих устойчивость к линезолиду у грамположительных микроорганизмов. Можно предположить наличие других механизмов резистентности, которые не были изучены в настоящем исследовании.

3.2 Определение МПК и МПК_М линезолида

По результатам оценки значений МПК линезолида в отношении исследуемых штаммов стафилококка, все четыре штамма *S. aureus* были охарактеризованы как чувствительные к линезолиду согласно критериям CLSI (значение МПК ≤ 2 мкг/мл). Значение МПК линезолида составило 2 мкг/мл в отношении *S. aureus* 479, *S. aureus* 688, *S. aureus* 2061 и *S. aureus* ATCC 700699.

Результаты определения МПК_М линезолида в отношении *S. aureus* 479, *S. aureus* 688, *S. aureus* 2061 и *S. aureus* ATCC 700699 представлены на Рисунке 25. Кривые зависимости численности жизнеспособных клеток от концентрации линезолида во всех случаях имели сходную форму. Численность клеток *S. aureus* систематически уменьшалась по мере увеличения концентрации антибиотика. Примечательно, что кривые зависимости численности клеток от концентрации линезолида, полученные с использованием смешанных инокулятов *S. aureus* (соотношение родительских

и мутантных клеток – 10^{10} КОЕ/мл на 10^2 КОЕ/мл), практически совмещались с кривыми, полученными без добавления резистентных мутантов.

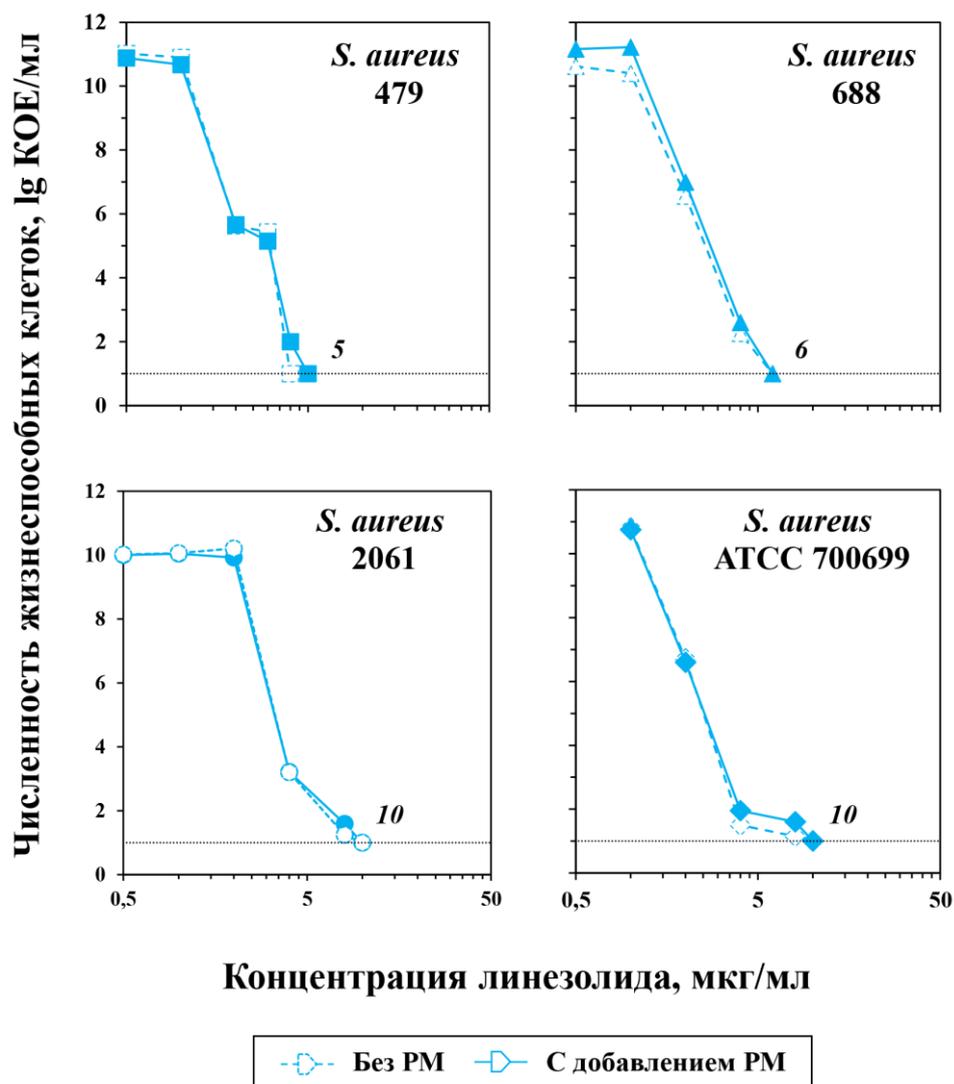


Рисунок 25. Определение МПК_М линезолида в отношении *S. aureus* в отсутствие и в присутствии устойчивых мутантов. Нижний предел определения обозначен пунктирной линией.

Как видно на рисунке, резкое подавление роста стафилококков происходило по достижении концентрации линезолида, равной 4 мкг/мл в случае *S. aureus* 2061 и 2 мкг/мл – в случае трёх других штаммов. Систематическое снижение численности жизнеспособных клеток каждого штамма продолжалось при дальнейшем увеличении содержания антибиотика в питательной среде. Значения МПК_М линезолида составляли 5 (*S. aureus* 479),

6 (*S. aureus* 688) и 10 мкг/мл (*S. aureus* 2061 и *S. aureus* ATCC 700699). Все последующие исследования в динамической системе *in vitro* проводились со смешанным инокулятом.

3.3 Фармакодинамика линезолида в отношении устойчивых к нему клеток *S. aureus*

При моделировании режимов многократного введения линезолида в соответствующих субтерапевтическим дозах наряду с чувствительными к нему клетками *S. aureus* были выявлены мутанты, устойчивые к 2×, 4× и 8×МПК антибиотика. Типичные кинетические кривые, полученные при воздействии линезолида на *S. aureus* 479, *S. aureus* 688, *S. aureus* 2061 и *S. aureus* ATCC 700699 (ПФК = 120 ч, Л120), показаны на Рисунке 26. Как видно на рисунке, во всех случаях происходило быстрое и интенсивное обогащение популяции стафилококков устойчивыми к линезолиду мутантами, вплоть до полного замещения чувствительных клеток устойчивыми. При этом были выделены мутанты, устойчивые к 2× и 4×МПК антибиотика; клетки, устойчивые к 8×МПК линезолида, обнаруживались нерегулярно.

Обогащение популяции *S. aureus* 479 мутантами, устойчивыми к 2×МПК линезолида, начиналось спустя 48 ч после начала введения антибиотика в динамическую систему. В дальнейшем их численность систематически возрастала и к концу эксперимента достигала 8 lg КОЕ/мл, приближаясь к общей численности стафилококков в тот же момент времени – 8,4 lg КОЕ/мл. Начиная с 72 ч в субпопуляции мутантов стали появляться клетки, устойчивые к 4×МПК линезолида, и их итоговая численность составила 4,9 lg КОЕ/мл. Численность мутантов, устойчивых к 8×МПК антибиотика, была значительно меньшей – 2,2 lg КОЕ/мл по окончании наблюдения. Вышеописанный характер роста мутантов наблюдался и у *S. aureus* 688, но в данном случае после 72 ч численность клеток, устойчивых к 2× и 4×МПК линезолида, различалась не более чем на 1,4 lg КОЕ/мл. Популяция двух других штаммов

непрерывно и интенсивно обогащалась клетками, устойчивыми как к 2×, так и 4×МПК линезолида, и их численность на 120 ч составила 8,7 (*S. aureus* 2061) и 7,4 (*S. aureus* ATCC 700699) lg КОЕ/мл. Значительная часть мутантов *S. aureus* ATCC 700699 также обладала устойчивостью к 8×МПК антибиотика (5,2 lg КОЕ/мл, 120 ч), в то время как в популяции *S. aureus* 2061 они отсутствовали вовсе.

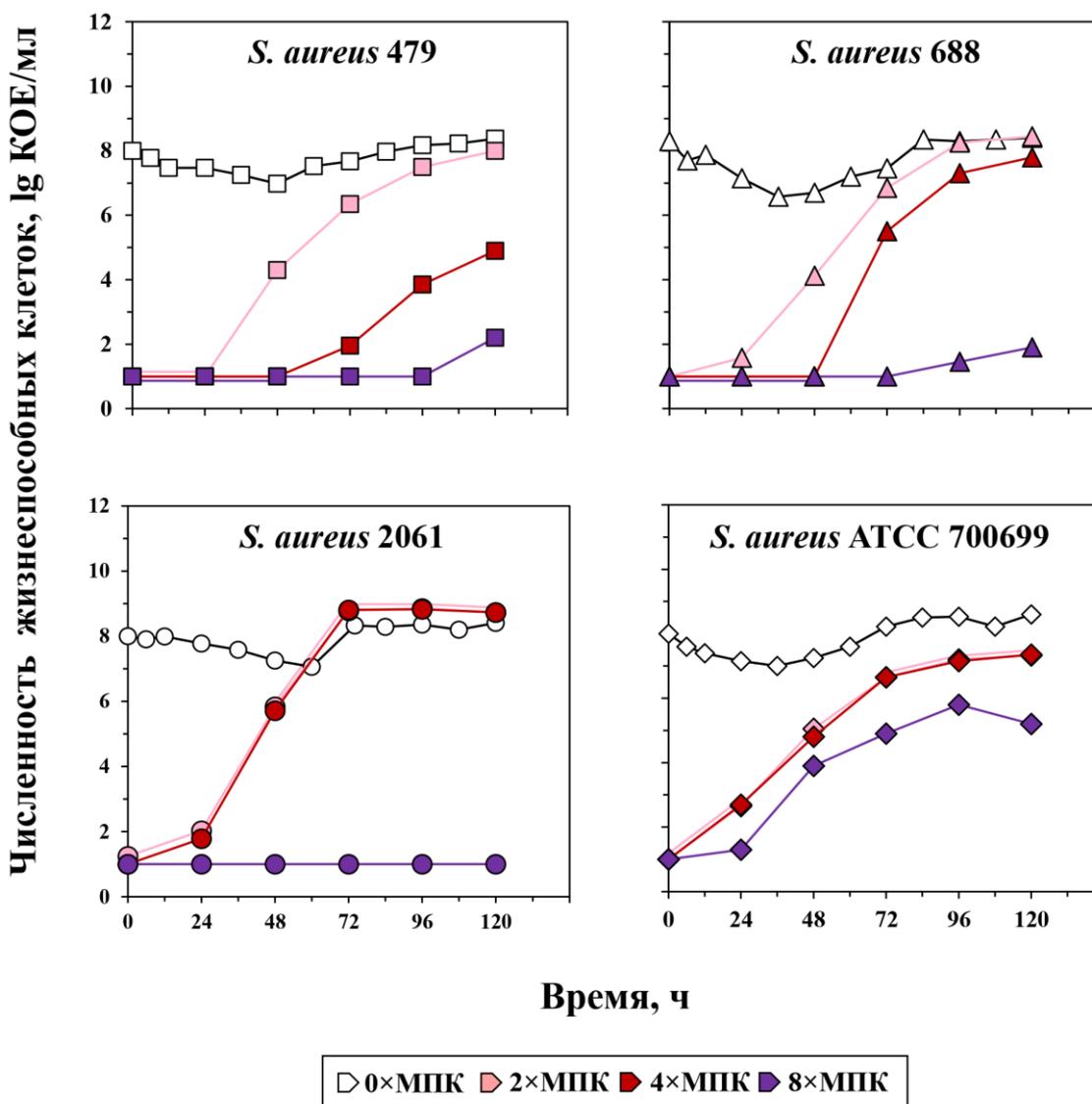


Рисунок 26. Кривые изменения численности клеток общей популяции и устойчивой субпопуляции *S. aureus* при моделировании субклинического режима дозирования линезолида (Л120).

С целью установления зависимости между численностью устойчивых к линезолиду клеток и режимом дозирования антибиотика моделировали его

фармакокинетику в 32-кратном диапазоне значений ПФК (от 15 до 480 мкг×ч/мл, режимы Л15-Л480) в отношении штаммов с различными значениями МПК_М: *S. aureus* 479, *S. aureus* 688 и *S. aureus* ATCC 700699. Штамм *S. aureus* 2061 не вошёл в это исследование, так как значения МПК и МПК_М линезолида в отношении этого штамма совпадают с таковыми для *S. aureus* ATCC 700699. Моделируемые фармакокинетические профили линезолида и соответствующие кинетические кривые изменения численности клеток *S. aureus*, устойчивых к 2×МПК антибиотика, показаны на Рисунке 27 (А, Б). Как видно на рисунке, форма кинетических кривых изменения численности мутантов зависит от положения профиля линезолида относительно ОСМ: в большинстве случаев накопление устойчивых к линезолиду клеток стафилококка происходило, когда концентрации антибиотика находились в его пределах в течение большей части интервала дозирования. Например, при моделировании режимов Л15 и Л30 (значения ПФК ниже клинической величины в 16 и 8 раз, соответственно) со штаммом *S. aureus* 479 профиль антибиотика был ниже ОСМ в течение всего или почти всего интервала дозирования, соответственно ($T_{\text{ОСМ}} = 0$ и 10 %, соответственно, $T_{>\text{МПК}_\text{М}} = 0$ %). В данных условиях рост мутантов практически отсутствовал (Л15) или был умеренным (Л30). Во втором случае численность устойчивых к линезолиду клеток плавно нарастала после 24 ч от первого введения антибиотика, и в конце наблюдения составила 3,8 lg КОЕ/мл.

При моделировании режимов Л60 и Л120 (значения ПФК ниже клинической величины в 4 и 2 раза, соответственно) бóльшая часть профиля линезолида попадала внутрь ОСМ ($T_{\text{ОСМ}} = 52-59$ %, $T_{>\text{МПК}_\text{М}} = 0-47$ %), что способствовало интенсивному обогащению популяции данного штамма устойчивыми стафилококками: их численность систематически увеличивалась, достигая итогового значения 8-8,6 lg КОЕ/мл. Рост мутантов сопровождался 2-4-кратным повышением МПК линезолида в отношении популяции *S. aureus*. При моделировании терапевтического режима Л240

уровни линезолида практически полностью выходили за верхний предел ОСМ ($T_{\text{ОСМ}} = 6\%$, $T_{>\text{МПК}_M} = 94\%$), и рост мутантов был слабым (численность в конце эксперимента $2,9 \lg$ КОЕ/мл). При дальнейшем повышении дозы линезолида (Л480) его профиль целиком располагался выше МПК_M ($T_{\text{ОСМ}} = 0\%$, $T_{>\text{МПК}_M} = 100\%$), что обусловило полное подавление роста мутантов. При моделировании режимов Л60-Л480 характер роста клеток, устойчивых к $2 \times \text{МПК}$ линезолида, у штаммов *S. aureus* 688 и *S. aureus* ATCC 700699 качественно не отличался от вышеописанного. В то же время при моделировании терапевтического режима Л240 численность мутантов *S. aureus* ATCC 700699 систематически возрастала до $5,3 \lg$ КОЕ/мл – сильнее, чем с двумя другими штаммами (до $2,9-3,7 \lg$ КОЕ/мл). Эти различия объясняются тем, что в случае коллекционного штамма уровни линезолида дольше оставались в пределах ОСМ ($T_{\text{ОСМ}} = 53\%$, $T_{>\text{МПК}_M} = 47\%$), чем для клинических штаммов ($T_{\text{ОСМ}} = 6-16\%$, $T_{>\text{МПК}_M} = 84-94\%$). При моделировании режимов Л15-Л30 наблюдалось значительное (до $5,5-6,2 \lg$ КОЕ/мл) обогащение популяции *S. aureus* 688 устойчивыми мутантами, а в популяции *S. aureus* ATCC 700699 они отсутствовали.

При моделировании данных режимов дозирования в популяции каждого штамма также шло накопление мутантов, устойчивых к $4 \times \text{МПК}$ линезолида, их численность возрастала слабее по сравнению с менее устойчивыми клетками у *S. aureus* 479, *S. aureus* 688, а в случае *S. aureus* ATCC 700699 численность тех и других мутантов в каждый момент времени практически совпадала (Приложение 1 (А, Б)). Содержание наиболее устойчивых мутантов ($8 \times \text{МПК}$ линезолида) *S. aureus* ATCC 700699 было ниже, чем менее устойчивых, или практически таким же, а в популяции двух других штаммов они выявлялись в минимальном количестве или отсутствовали вовсе (Приложение 2 (А, В)). Стоит отметить, что при клинически реализуемом режиме Л240 мутанты с уровнем устойчивости выше $2 \times \text{МПК}$ линезолида были выявлены у *S. aureus* ATCC 700699, но не у *S. aureus* 479 и *S. aureus* 688.

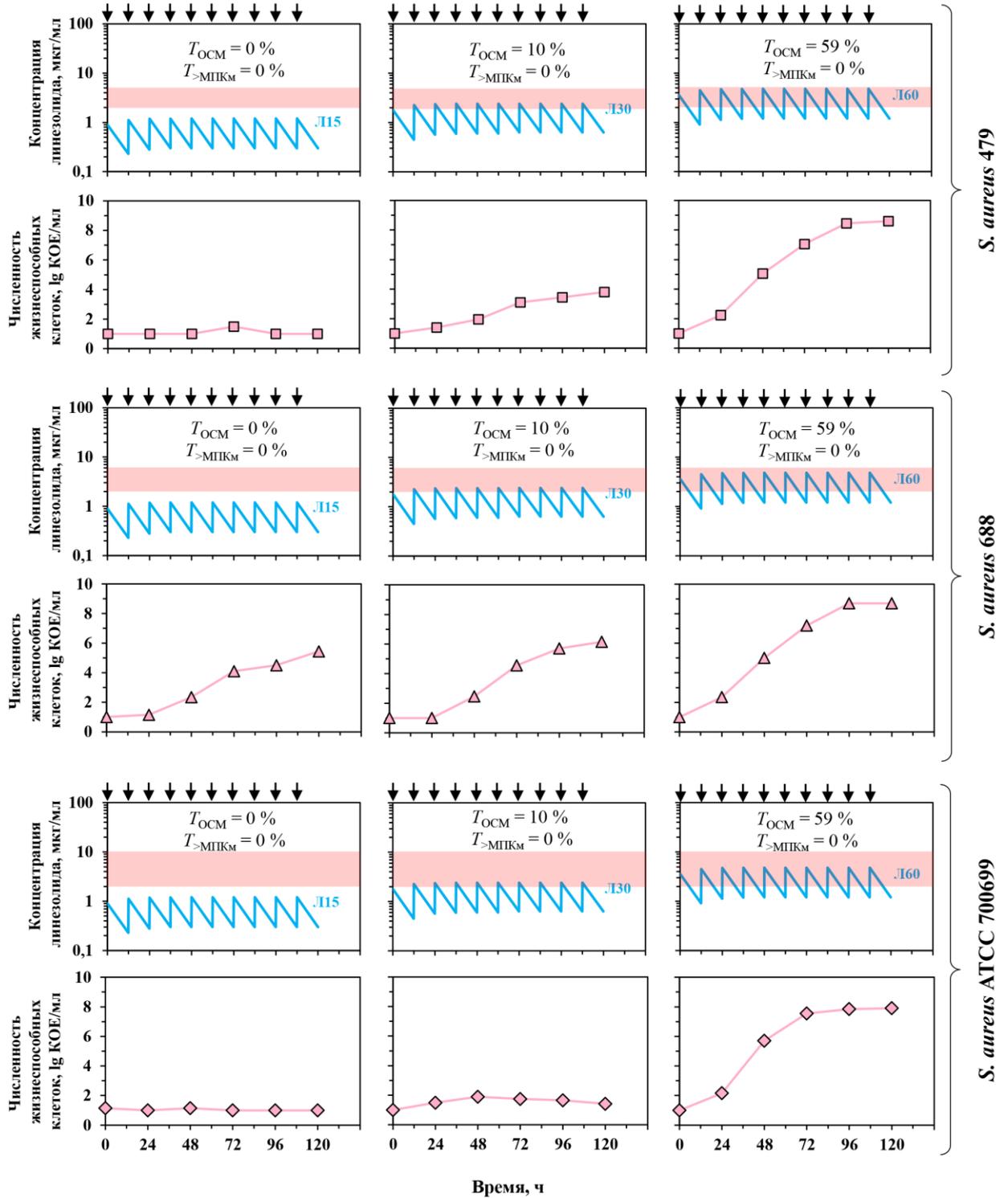


Рисунок 27 (А). Моделируемые профили линезолида и кинетические кривые изменения численности мутантов *S. aureus*, устойчивых к $2 \times \text{МПК}$ линезолида. Моменты введения линезолида обозначены стрелками. ОСМ обозначены закрашенными областями.

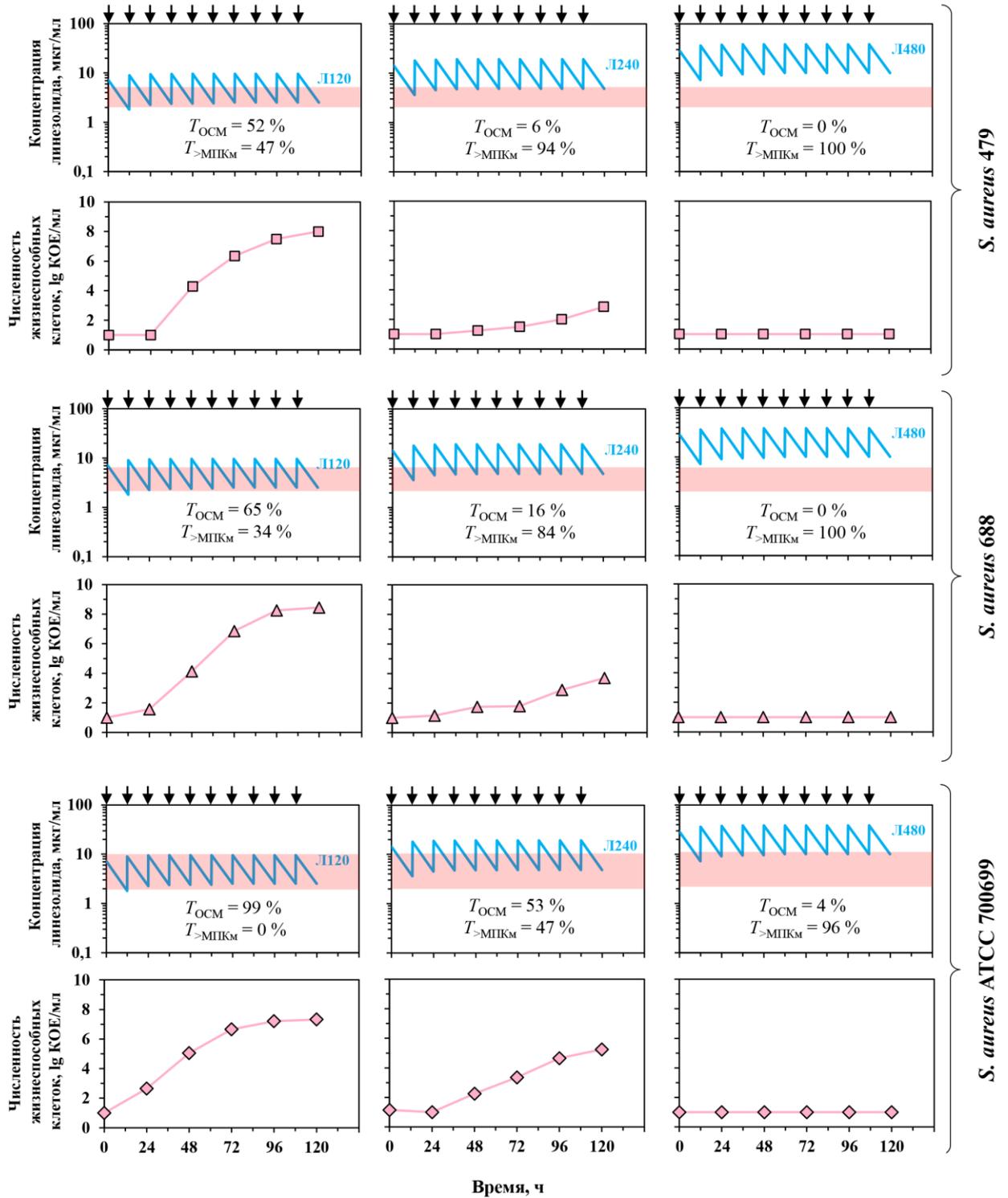


Рисунок 27 (Б). Моделируемые профили линезолида и кинетические кривые изменения численности мутантов *S. aureus*, устойчивых к 2×МПК линезолида. Моменты введения линезолида обозначены стрелками. ОСМ обозначены закрашенными областями.

3.4 Поиск оптимального предиктора развития устойчивости *S. aureus* к линезолиду

С целью установления зависимости «антимутантного» эффекта линезолида от фармакокинетико-фармакодинамических параметров были рассчитаны значения интегрального параметра ППК_М для каждой кинетической кривой, отражающей изменения численности устойчивых стафилококков во времени.

Зависимости между величиной ППК_М, характеризующей численность мутантов *S. aureus* 479, *S. aureus* 688 и *S. aureus* ATCC 700699, устойчивых к 2×МПК линезолида, и значением ПФК/МПК или ПФК/МПК_М показаны на Рисунке 28 (А1, Б1). Как видно на рисунке, соответствующие кривые для всех штаммов по форме напоминают купол. В случае ПФК/МПК они расположены друг над другом и частично совмещаются, в случае ПФК/МПК_М – расслаиваются вдоль оси абсцисс. Кривые для соответствующих значений $T_{ОСМ}$ имеют аналогичную форму и характеризуются сходным положением на графиках (Рисунок 28 (А2, Б2)). В обоих случаях прослеживается зависимость между интенсивностью обогащения популяции стафилококков устойчивыми клетками и длительностью пребывания профиля линезолида внутри ОСМ: чем больше $T_{ОСМ}$, тем сильнее рост мутантов. Так, наибольший прирост устойчивой субпопуляции (ППК_М = 448-554 lg (КОЕ/мл)×ч) наблюдался при отношениях ПФК/МПК, равных 30 и 60 ч. Им соответствовали значения $T_{ОСМ}$ в диапазонах 52-59% (*S. aureus* 479), 59-65% (*S. aureus* 688) и 59-99% (*S. aureus* ATCC 700699). При меньших значениях ПФК/МПК (7,5 и 15 ч; $T_{ОСМ}$ = 0-10%) устойчивость развивалась менее интенсивно или не наблюдалась вовсе (ППК_М не выше 295 lg (КОЕ/мл)×ч). При большем клинически реализуемом значении данного параметра (120 ч) рост мутантов *S. aureus* ATCC 700699 ($T_{ОСМ}$ = 53%) подавлялся умеренно (ППК_М = 227 lg (КОЕ/мл)×ч), а мутантов *S. aureus* 479 ($T_{ОСМ}$ = 6%) и *S. aureus* 688 ($T_{ОСМ}$ = 16%) – значительно (ППК_М = 64 и 119 lg (КОЕ/мл)×ч, соответственно). Максимальной величине ПФК/МПК (240 ч;

$T_{\text{ОСМ}} = 0-4\%$) соответствовало полное подавление обогачения популяций всех штаммов устойчивыми клетками («антимутантная» величина для изученных штаммов).

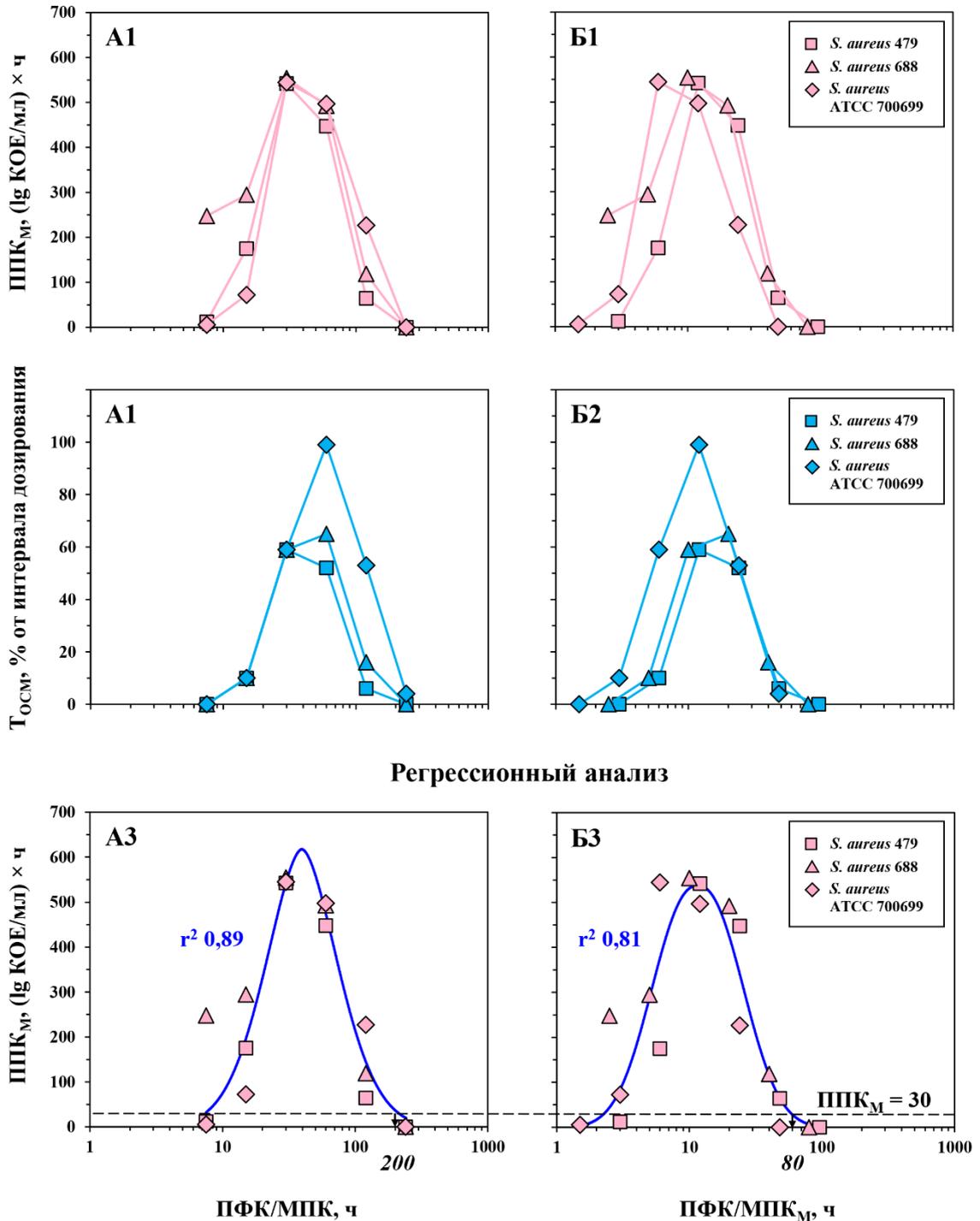


Рисунок 28. Зависимости ППК_M для мутантов *S. aureus*, устойчивых к $2 \times \text{МПК}$ линезолида, и $T_{\text{ОСМ}}$ от $\text{ПФК}/\text{МПК}$ и $\text{ПФК}/\text{МПК}_M$. Регрессионные зависимости для данных, объединённых по трём штаммам, описаны Уравнением 18: $Y_0 = 1$, $x_0 = 1,5955$, $a = 617,8401,6$, $b = 0,2614$, $c = 1,7326$ (А3), $Y_0 = 1$, $x_0 = 1,0650$, $a = 538,4279$, $b = 0,3304$, $c = 2,2846$ (Б3).

Те же зависимости для параметра ПФК/МПК_М отличаются количественно, но не качественно. «Антимутантные» значения данного параметра составили 48-96 ч при $T_{\text{ОСМ}} = 0-4\%$ в зависимости от штамма.

Минимальное расслоение индивидуальных кривых каждого штамма в системах координат ПФК/МПК-ППК_М и ПФК/МПК_М-ППК_М позволяет объединить данные и описать их уравнением Гаусса (Рисунок 28 (А3, Б3)) с высокими коэффициентами корреляции ($r^2 = 0,89$ и $0,81$, соответственно) (Уравнение 18). Пороговые значения параметров ПФК/МПК и ПФК/МПК_М (значения соответствующие значению ППК_М = $30 \lg (\text{КОЕ/мл}) \times \text{ч}$ (Strukova et al., 2016b)), установленные при помощи указанных зависимостей, составляют 200 и 80 ч, соответственно. Пороговое значение ПФК/МПК линезолида почти в два раза превышает его терапевтическое значение для изученных штаммов *S. aureus* (МПК линезолида равно 2 мкг/мл, ПФК/МПК = 120 ч). То же касается и порогового значения ПФК/МПК_М (80 ч): при сопоставлении его с терапевтическими значениями (24-48 ч), последние оказались в 1,5-3,5 раза ниже. Пороговое значение МПК_М линезолида в отношении штаммов стафилококка, ассоциированное с подавлением роста резистентности при применении антибиотика в терапевтической дозе составляет 4 мкг/мл.

При анализе зависимостей «ППК_М – ПФК/МПК» для индивидуальных штаммов *S. aureus*, показанных на Рисунке 29 (левые панели), нисходящей половине каждой кривой соответствовали значения $T_{>\text{МПК}_\text{М}} > 0$. Использование такого разделения при построении соответствующих графиков зависимости ППК_М от $T_{\text{ОСМ}}$ позволяет увидеть петлю гистерезиса: для верхней части кривой выполняется условие $T_{>\text{МПК}_\text{М}} = 0$, а для нижней – $T_{>\text{МПК}_\text{М}} > 0$ (Рисунок 29 (правые панели)). Как можно заметить, величина ППК_М возрастала при повышении $T_{\text{ОСМ}}$ даже в случае превышения концентрациями антибиотика уровня МПК_М. В то же время, при одном и том же значении $T_{\text{ОСМ}}$ величина ППК_М, которая соответствует верхнему фрагменту петли, всегда была больше величины ППК_М, соответствующей нижнему ее фрагменту. Например, при

$T_{OCM} = 50\%$, величины ППК_М для *S. aureus* 688, *S. aureus* 479 и *S. aureus* ATCC 700699, подвергнутых воздействию линезолида в концентрациях ниже уровня МПК_М ($T_{>МПКМ} = 0$), были соответственно в 1,1, 1,3 и 2,2 раза выше величин, полученных при уровнях антибиотика частично или полностью выше МПК_М ($T_{>МПКМ} > 0$).

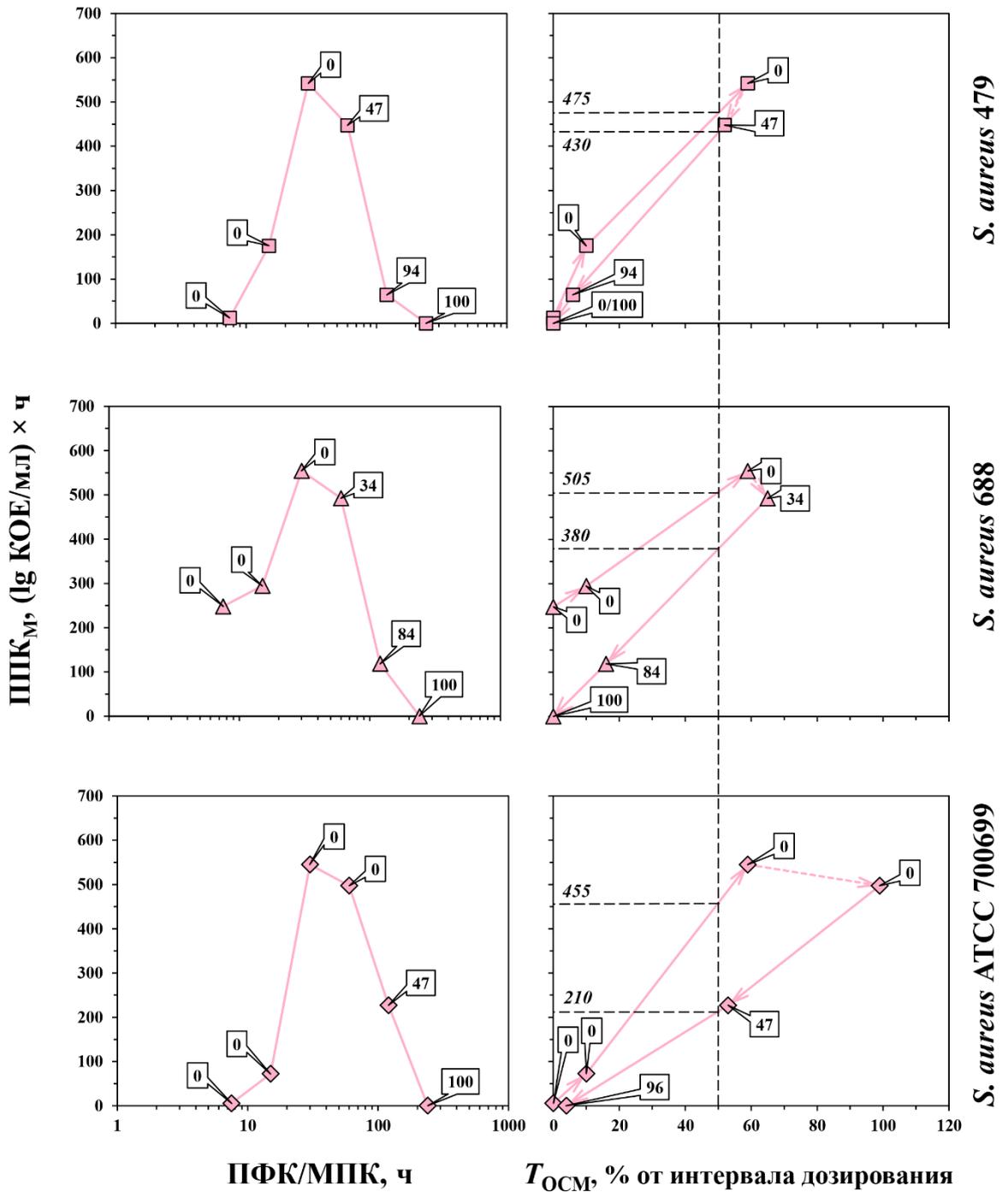


Рисунок 29. Зависимости ППК_М для мутантов *S. aureus*, устойчивых к 2×МПК линезолида, от ПФК/МПК и T_{OCM} . Значения $T_{>МПКМ}$ указаны в выносках.

Зависимость величин ППК_М, относящихся к нижней кривой гистерезиса ($T_{>МПКМ} > 0$), от $T_{ОСМ}$ была описана сигмоидной функцией с $r^2 = 0,91$ (Уравнение 19). Та же функция описывает зависимость ППК_М от $T_{>МПКМ}$ ($r^2 = 0,91$), причём вторая кривая представляет собой зеркальное отражение первой (Рисунок 30 (А, Б)).

Отмеченная гетерогенность окна селекции мутантов снижает надежность параметра $T_{ОСМ}$, как предиктора резистентности, поскольку одному и тому же значению $T_{ОСМ}$ могут соответствовать принципиально разные уровни устойчивости. В этом смысле более предпочтительным представляется параметр $T_{>МПКМ}$ (Рисунок 28 (Б)). Основываясь на зависимости «ППК_М – $T_{>МПКМ}$ », прогнозируемое пороговое «антимутантное» значение $T_{>МПКМ}$ оказывается близким к 100%. Такие значения параметра $T_{>МПКМ}$ могут быть достигнуты при применении линезолида в терапевтической дозе только в том случае, если значение его МПК_М в отношении бактериального штамма не превышает 4 мкг/мл.

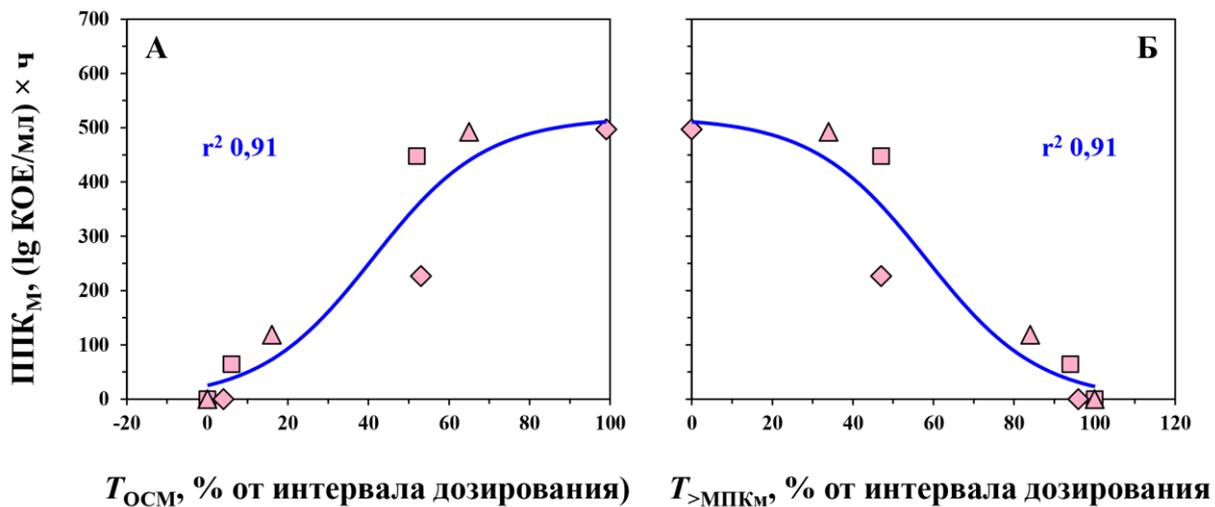


Рисунок 30. Зависимости ППК_М для мутантов, устойчивых к 2×МПК линезолида (объединённые данные по трём штаммам *S. aureus*), от $T_{ОСМ}$ и $T_{>МПКМ}$, описываемые Уравнением 19: $Y_0 = 0$, $x_0 = 41,036$, $a = 519,080$, $b = 13,947$, (А), $Y_0 = 0$, $x_0 = 58,085$, $a = 522,155$, $b = -14,062$ (Б)

Описанный выше анализ связи между резистентностью *S. aureus* к линезолиду и фармакокинетико-фармакодинамическими параметрами был проведён на примере мутантов, резистентных к 2×МПК линезолида, но полученные закономерности были справедливы и для более устойчивых клеток золотистого стафилококка. Значения ППК_М для мутантов, устойчивых к 4×МПК линезолида, различались между штаммами сильнее, чем аналогичные значения для менее устойчивых мутантов (Рисунок 31). На первый взгляд, в этом случае объединение данных для оценки их корреляции со значениями предикторов затрудняется. С другой стороны, анализ таких результатов даёт возможность увидеть идентичные зависимости между эффектом антибиотика в отношении индивидуальных штаммов и соответствующим фармакокинетико-фармакодинамическим параметром, вне зависимости от абсолютной величины эффекта. Как показано на Рисунке 31, каждая кривая, описывающая зависимость между величиной ППК_М, характеризующей численность мутантов *S. aureus* 479, *S. aureus* 688 или *S. aureus* ATCC 700699, устойчивых к 4×МПК линезолида, и значением ПФК/МПК, имеет вид купола, высота которого увеличивается в порядке перечисления штаммов. Так же как и в случае с мутантами, резистентными к 2×МПК линезолида, в этом случае нисходящей половине каждой кривой соответствовали значения $T_{>МПКМ} > 0$.

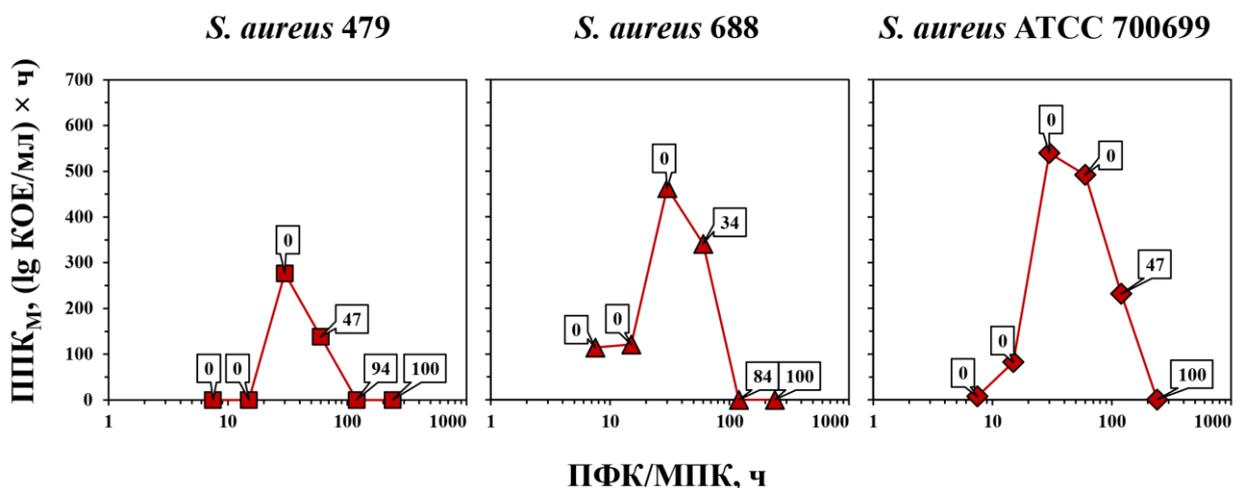


Рисунок 31. Зависимости ППК_М для мутантов *S. aureus*, устойчивых к 4×МПК линезолида, от ПФК/МПК и $T_{ОСМ}$. Значения $T_{>МПКМ}$ указаны в выносках.

Как было сказано выше, индивидуальные зависимости для субпопуляции стафилококков, устойчивых к 4×МПК линезолида, качественно совпадали у трёх штаммов, однако абсолютные значения ППК_М были штаммоспецифичными. Так, максимальные значения ППК_М для *S. aureus* 479, *S. aureus* 688 и *S. aureus* ATCC 700699, полученные при одном и том же значении ПФК/МПК (30 ч), были равны 277, 463 и 539 lg КОЕ/мл (разница почти в 2 раза). По этой причине объединение данных проводили после нормирования: значения ППК_М для каждого штамма были выражены в процентном отношении от индивидуального максимума. Зависимости нормированных значений от ПФК/МПК и ПФК/МПК_М были описаны уравнением Гаусса (Уравнение 18) с высокими коэффициентами корреляции ($r^2 = 0,88$ и $0,79$ (Рисунок 32 (А, Б)), соответственно, соответствующие коэффициенты для ненормированных данных составили 0,64 и 0,59 (Приложение 3).

Зависимость нормированных величин ППК_М (для случаев, когда $T_{>МПКМ} > 0$), от $T_{ОСМ}$ была описана сигмоидной функцией с $r^2 = 0,99$ (Уравнение 19). Та же функция описывает зависимость ППК_М от $T_{>МПКМ}$ ($r^2 = 0,99$), (Рисунок 32 (В, Г)).

Анализ популяционных данных, полученных для мутантов, устойчивых к 8×МПК линезолида не проводили, поскольку систематические изменения их численности были зафиксированы лишь у *S. aureus* ATCC 700699.

По результатам проведенного анализа можно сделать вывод, что параметры ПФК/МПК, ПФК/МПК_М и $T_{>МПКМ}$ одинаково хорошо коррелируют с развитием устойчивости *S. aureus* к линезолиду. Вместе с тем, зависимость «ППК_М – ПФК/МПК» была построена на основании данных, полученных для штаммов с одинаковыми значениями МПК, и вопрос о её применимости для прогнозирования «антимутантного» эффекта линезолида в отношении штаммов стафилококка со значениями МПК линезолида, отличающимися от 2 мкг/мл, остаётся открытым. Такой проблемы не было в случае применения в

качестве предикторов резистентности параметров ПФК/МПК_М и $T_{>МПК_М}$, поскольку значения МПК_М линезолида в отношении всех изученных штаммов стафилококка различались. В этой связи именно эти параметры можно считать наиболее предпочтительными для использования в качестве предикторов резистентности *S. aureus* к линезолиду. Прогнозируемые пороговые «антимутантные» значения ПФК/МПК_М и $T_{>МПК_М}$ составили 80 ч и 100 % от интервала дозирования, соответственно, а спрогнозированные на их основе пороговые значения МПК_М линезолида оказались равными и составили 4 мкг/мл.

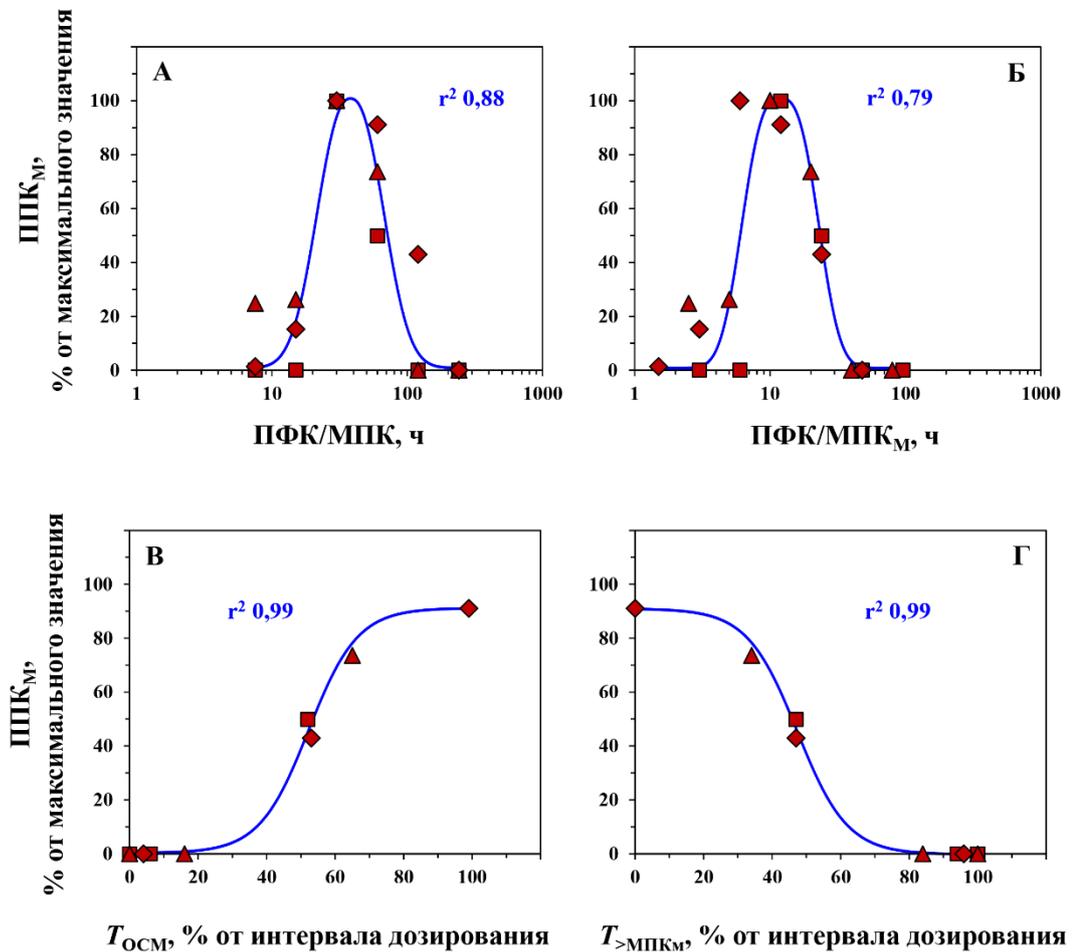


Рисунок 32. Зависимости ППК_М для мутантов, устойчивых к 4×МПК линезолида (объединённые данные по трём штаммам *S. aureus*), от ПФК/МПК, ПФК/МПК_М, $T_{ОСМ}$ и $T_{>МПК_М}$, описываемые Уравнением 18: $Y_0 = 1, x_0 = 1,5811, a = 100, b = 0,2366, c = 2,3411$ (А), $Y_0 = 1, x_0 = 1,0738, a = 100, b = 0,2619, c = 2,8533$ (Б) и Уравнением 19: $Y_0 = 0, x_0 = 52,0275, a = 91,1012, b = 7,1635$ (В), $Y_0 = 0, x_0 = 47,6601, a = 91,1012, b = -7,3272$ (Г).

3.5 Фармакодинамика линезолида в отношении общей популяции клеток *S. aureus*

Антистафилококковый эффект линезолида зависел от режима его дозирования и был качественно схожим в отношении всех изученных штаммов (Рисунок 33). Так, при трёх меньших значениях ПФК линезолида (15, 30 и 60 мкг×ч/мл - ниже клинической величины в 16, 8 и 4 раза, соответственно) численность общей популяции клеток *S. aureus* 479, *S. aureus* 688 и *S. aureus* ATCC 700699 не снижалась. Напротив, плотность инокулята по мере наблюдения возрастала примерно на 0,5-1 lg КОЕ/мл в зависимости от штамма и режима дозирования. При повышении ПФК линезолида до 120 мкг×ч/мл, численность жизнеспособных клеток *S. aureus* 479 и *S. aureus* ATCC 700699 уменьшалась на 1 lg КОЕ/мл, а *S. aureus* 479 – на 1,4 lg КОЕ/мл. В результате вторичного роста плотность популяции стафилококков возвращалась к исходному значению не позднее, чем через 84 ч после начала введения антибиотика. При моделировании клинического режима дозирования линезолида (Л240) снижение численности бактерий было более выраженным: численность *S. aureus* 479, *S. aureus* 688 и *S. aureus* ATCC 700699 снижалась на 2,1, 2,5 и 1,2 lg КОЕ/мл, соответственно. Введение линезолида в дозах, вдвое превышающих клинические (Л480), приводило к уменьшению количества жизнеспособных клеток вышеперечисленных штаммов на 2,2, 2,4 и 1,8 lg КОЕ/мл, соответственно. При моделировании двух последних режимов дозирования антибиотика численность клеток *S. aureus* 479 и *S. aureus* 688 оставалась ниже 8 lg КОЕ/мл на протяжении всего периода наблюдения, а численность *S. aureus* ATCC 700699 превосходила данную величину спустя 60 ч (Л240) и 108 ч (Л480) от начала эксперимента.

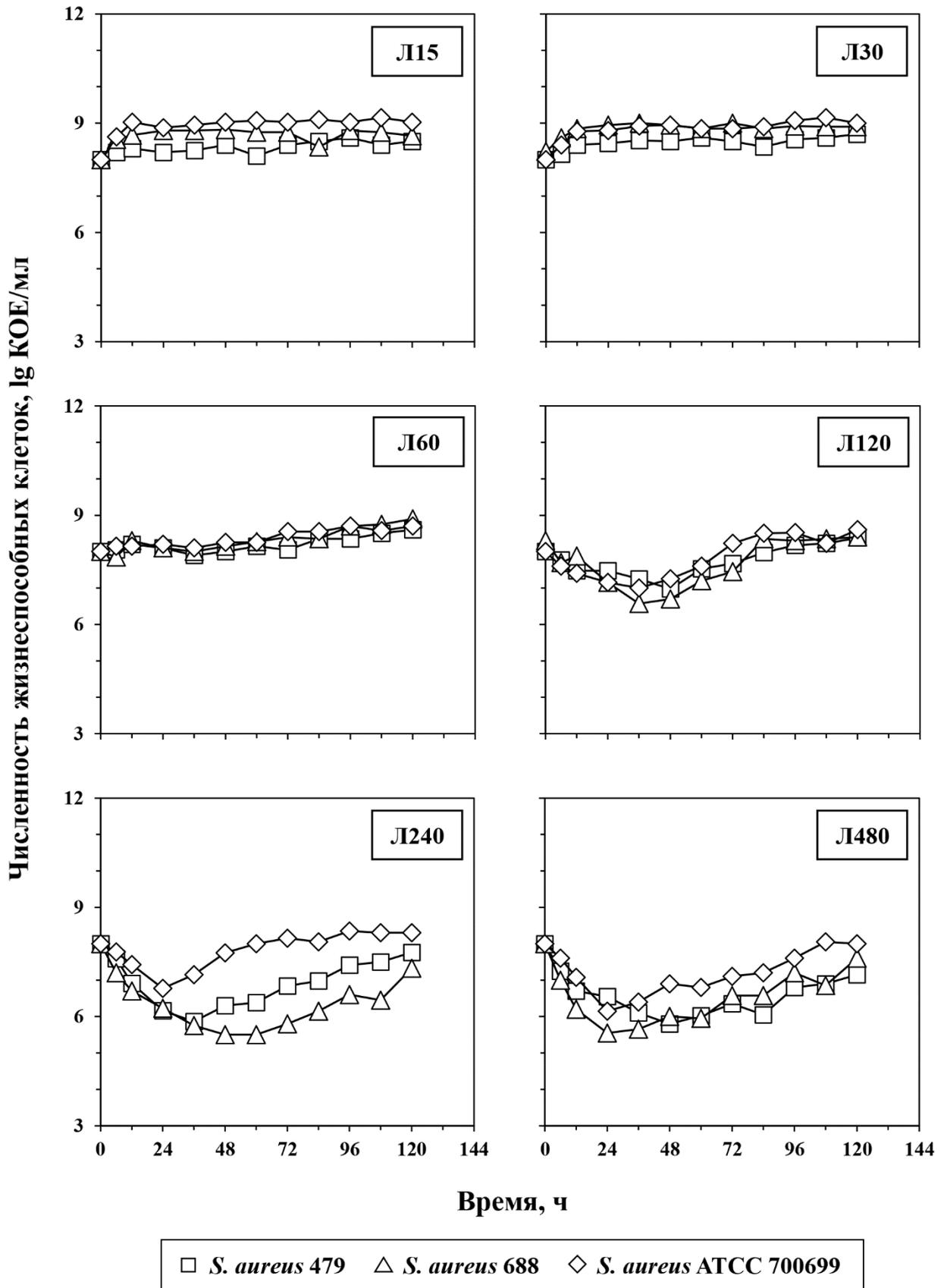


Рисунок 33. Кинетические кривые изменения численности клеток общей популяции *S. aureus*.

Для интегральной оценки эффекта воздействия линезолида на общую популяцию стафилококков были рассчитаны значения ППК для *S. aureus* 479, *S. aureus* 688 и *S. aureus* ATCC 700699 при моделировании каждого режима дозирования линезолида. Между значениями ППК (объединённые данные по трём штаммам) и ПФК/МПК была установлена зависимость, описываемая сигмоидной функцией (Уравнение 19) с $r^2 = 0,82$ (Рисунок 34).

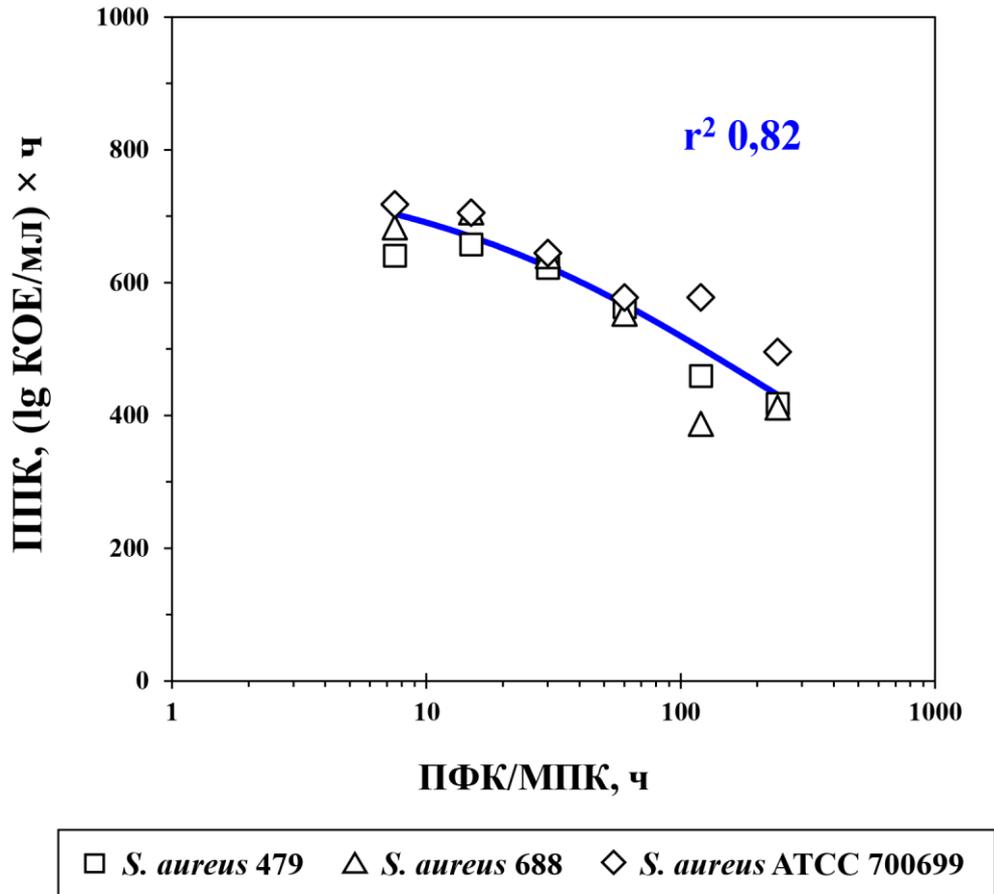


Рисунок 34. Зависимость ППК от ПФК/МПК, описываемая Уравнением 19: $Y_0 = 0$, $x_0 = 2,468$, $a = 733,2$, $b = -0,7060$.

**ГЛАВА 4. ФАРМАКОДИНАМИКА ЛИНЕЗОЛИДА И ДАПТОМИЦИНА
ПО ОТДЕЛЬНОСТИ И В КОМБИНАЦИИ В ОТНОШЕНИИ
УСТОЙЧИВЫХ И ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Описанные в предыдущей главе исследования в динамических системах позволили установить пороговые значения ПФК линезолида, препятствующие селекции устойчивых к линезолиду мутантов *S. aureus* 479, 688 и ATCC 700699: 240, 240 и 480 мкг×ч/мл, соответственно. Как было отмечено выше, «антимутантное» значение ПФК линезолида в отношении штамма *S. aureus* ATCC 700699 (ПФК = 480 мкг×ч/мл; МПК = 2 мкг/мл; МПК_М = 10 мкг/мл) недостижимо при рекомендованном режиме дозирования (600 мг каждые 12 ч; ПФК = 240 мкг×ч/мл). Возможно, это относится и к клиническому штамму *S. aureus* 2061, характеризующемуся таким же значением МПК_М (10 мкг/мл). Поскольку повышение дозы линезолида сопряжено с высоким риском развития нежелательных побочных эффектов, возможным выходом из положения является комбинированная терапия.

Как было отмечено в обзоре литературы (Глава 4), по результатам исследований фармакодинамики линезолида и даптомицина в отношении устойчивых субпопуляций *S. aureus* в динамических системах, не было сделано выводов о влиянии комбинирования препаратов на их «антимутантный» эффект. Выводы о перспективности сочетанного применения линезолида с даптомицином для терапии стафилококковых инфекций, сделанные на основании оценки МПК методом шахматной доски, исследований кинетики гибели *S. aureus* в статических условиях и фармакодинамики в отношении общей популяции *S. aureus* в динамических системах, противоречивы. С целью оценки возможности преодоления устойчивости стафилококков к линезолиду под воздействием этой комбинации проведены фармакодинамические исследования с двумя штаммами *S. aureus*: ATCC 700699 и 2061.

4.1 Определение МПК_М и МПК линезолида и даптомицина

Результаты определения МПК_М линезолида и даптомицина в отдельности и в комбинации представлены на Рисунке 35. Как видно на рисунке, кривые зависимости численности стафилококков от концентрации линезолида и даптомицина имеют сходную форму. Во всех случаях по мере увеличения содержания антибиотиков в питательной среде происходило систематическое снижение численности жизнеспособных клеток *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061. Для обоих штаммов значения МПК_М линезолида составляли 10 мкг/мл. Величина МПК_М даптомицина для *S. aureus* 2061 равнялась 10 мкг/мл, а для *S. aureus* ATCC 700699 – 14 мкг/мл.

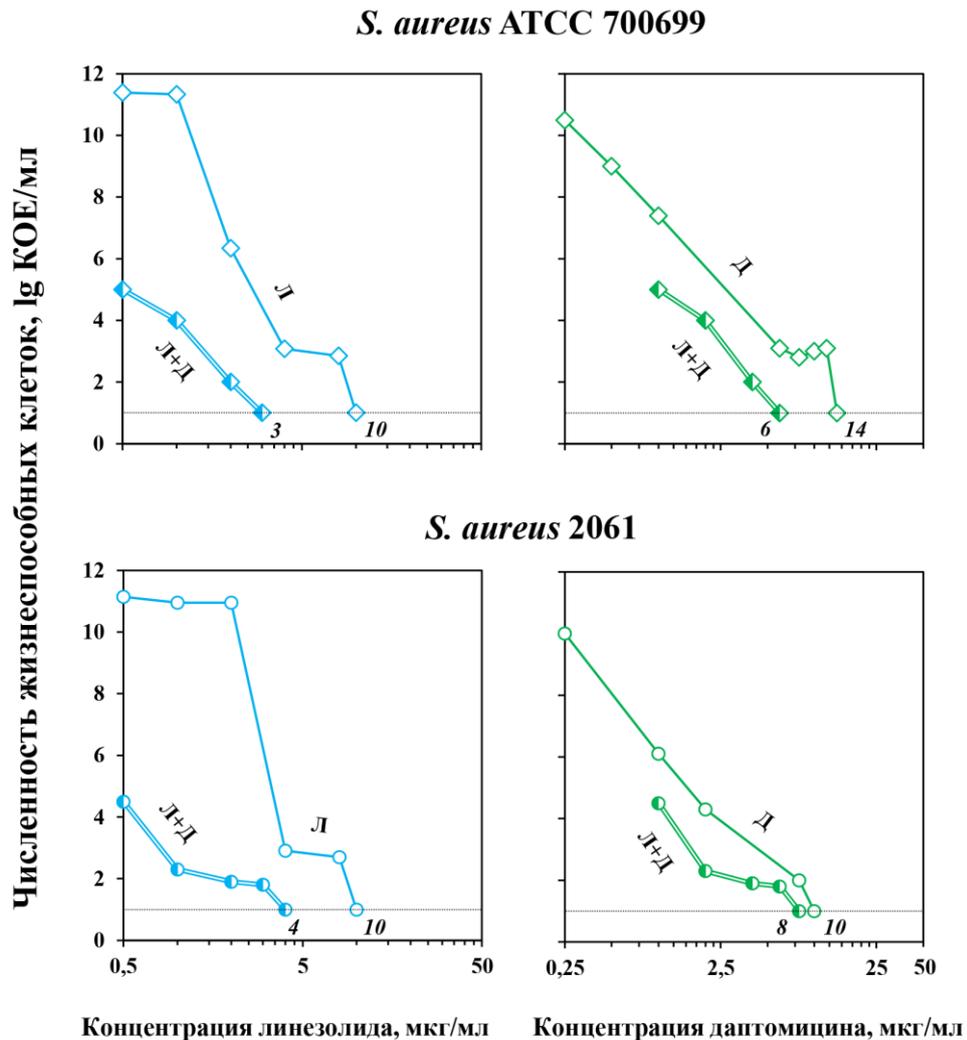


Рисунок 35. Определение МПК_М линезолида и даптомицина по отдельности и в присутствии друг друга при соотношении их концентраций, равном 1:2. Нижний предел определения обозначен пунктирной линией.

На том же рисунке показаны кривые зависимости численности стафилококков от концентрации антибиотиков при соотношении их концентраций, равном 1:2, что соответствует отношению значений ПФК антибиотиков при рекомендованных режимах дозирования – 600 мг линезолида каждые 12 ч и 4 мг/кг даптомицина каждые 24 ч. Эти кривые сдвинуты влево вдоль оси абсцисс относительно соответствующих кривых для каждого антибиотика в отдельности, что отражает более интенсивное подавление роста микробов при использовании комбинации линезолида с даптомицином. Например, разница в численности жизнеспособных клеток *S. aureus* 2061, подвергнутых воздействию линезолида, в отсутствие и в присутствии даптомицина достигла 9 lg КОЕ/мл. Результатом сдвига кривых стало снижение МПК_М линезолида и, в меньшей степени, даптомицина. Так, под действием даптомицина значения МПК_М линезолида в отношении штаммов *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061 снизились в 3,3 и 2,5 раза (с 10 до 3 и 4 мкг/мл, соответственно). С другой стороны, под влиянием линезолида произошло 2,3- и 1,3-кратное снижение МПК_М даптомицина в отношении штаммов *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061 (с 14 и 10 до 6 и 8 мкг/мл, соответственно).

При этом под влиянием даптомицина значения МПК линезолида в отношении штаммов *S. aureus* 2061 и ATCC 700699 снижались в 16 раз (с 2 до 0,125 мкг/мл), а под влиянием линезолида величина МПК даптомицина в отношении штамма *S. aureus* ATCC 700699 снизилась в 2 раза (с 0,5 до 0,25 мкг/мл) и не изменилась в отношении штамма *S. aureus* 2061 (0,25 мкг/мл).

4.2 Фармакодинамика комбинации линезолида с даптомицином в отношении устойчивой субпопуляции *S. aureus*

Для оценки «антимутантного» эффекта в отношении обоих штаммов *S. aureus* в модифицированной динамической системе *in vitro* (Глава 6) моделировали фармакокинетические профили антибиотиков отдельно и в

комбинации (при том же фармакокинетически-обоснованном соотношении 1:2) при терапевтических и субтерапевтических режимах дозирования линезолида (ПФК = 240 и 120 мкг×ч/мл) и даптомицина (ПФК = 480 и 240 мкг×ч/мл). Линезолид вводили каждые 12 ч, даптомицин – каждые 24 ч на протяжении 5 дней. Моделируемые фармакокинетические профили линезолида и даптомицина и соответствующие кинетические кривые изменения численности клеток *S. aureus*, устойчивых к 2×МПК антибиотика показаны на Рисунке 36 и Рисунке 37.

При моделировании терапевтического режима дозирования линезолида его уровни находились внутри ОСМ в течение примерно половины интервала дозирования ($T_{\text{ОСМ}} = 53\%$, $T_{>\text{МПК}_M} = 47\%$ в отношении обоих штаммов), и обогащение популяции *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061 устойчивыми к линезолиду мутантами начиналось спустя 48 ч (Рисунок 36). Численность устойчивых клеток обоих штаммов непрерывно возрастала, превысив 5 lg КОЕ/мл по окончании периода наблюдения. Фармакокинетический профиль линезолида, соответствующий субтерапевтическому режиму, практически полностью попадал в ОСМ ($T_{\text{ОСМ}} = 99\%$, $T_{>\text{МПК}_M} = 0\%$ в отношении обоих штаммов). В этом случае численность устойчивых к линезолиду мутантов возрастала быстрее: до 5 lg КОЕ/мл через 48 ч у обоих штаммов, и до 8 lg КОЕ/мл через 96 и 72 ч у штаммов *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061, соответственно. Следует отметить, что данные результаты экспериментов с линезолидом при моделировании его монотерапии в отношении штамма *S. aureus* ATCC 700699 совпадают с ранее полученными результатами, описанными в предыдущей главе.

В результате снижения МПК_М линезолида под действием даптомицина, уровни линезолида оказались выше МПК_М при моделируемом терапевтическом ($T_{>\text{МПК}_M} = 100$ и 97% в отношении *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061, соответственно) и более чем наполовину превысили МПК_М при субтерапевтическом ($T_{>\text{МПК}_M} = 84$ и 63% в отношении *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061, соответственно) режимах дозирования. Рост устойчивых к

линезолиду мутантов обоих штаммов полностью подавлялся под воздействием обеих комбинаций.

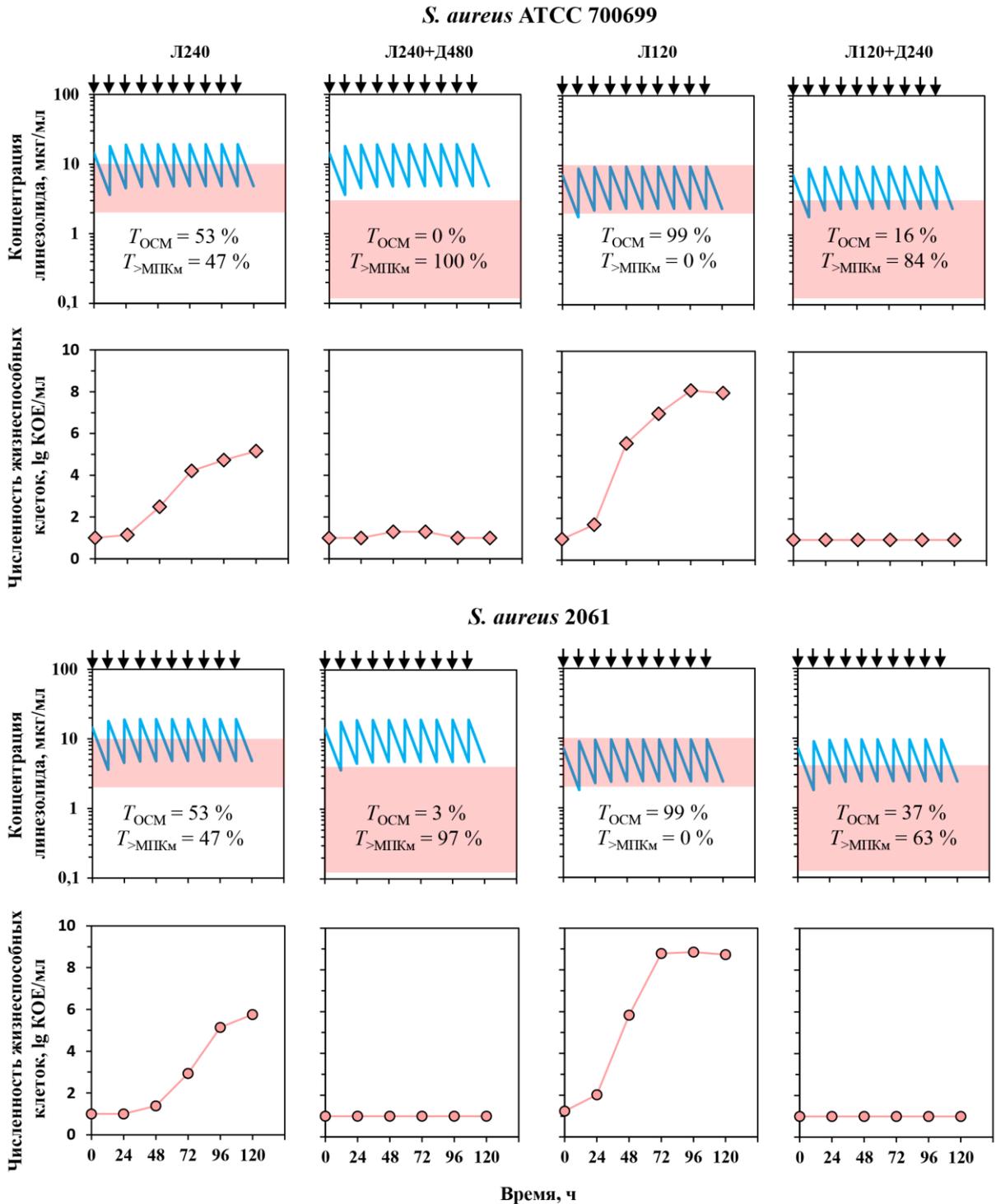


Рисунок 36. Моделируемые профили линезолида и кинетические кривые изменения численности мутантов *S. aureus*, устойчивых $2 \times \text{МПК}$ линезолида при моделируемых терапевтических и субтерапевтических значениях ПФК при отсутствии и в присутствии даптомицина. ОСМ обозначены закрашенными областями.

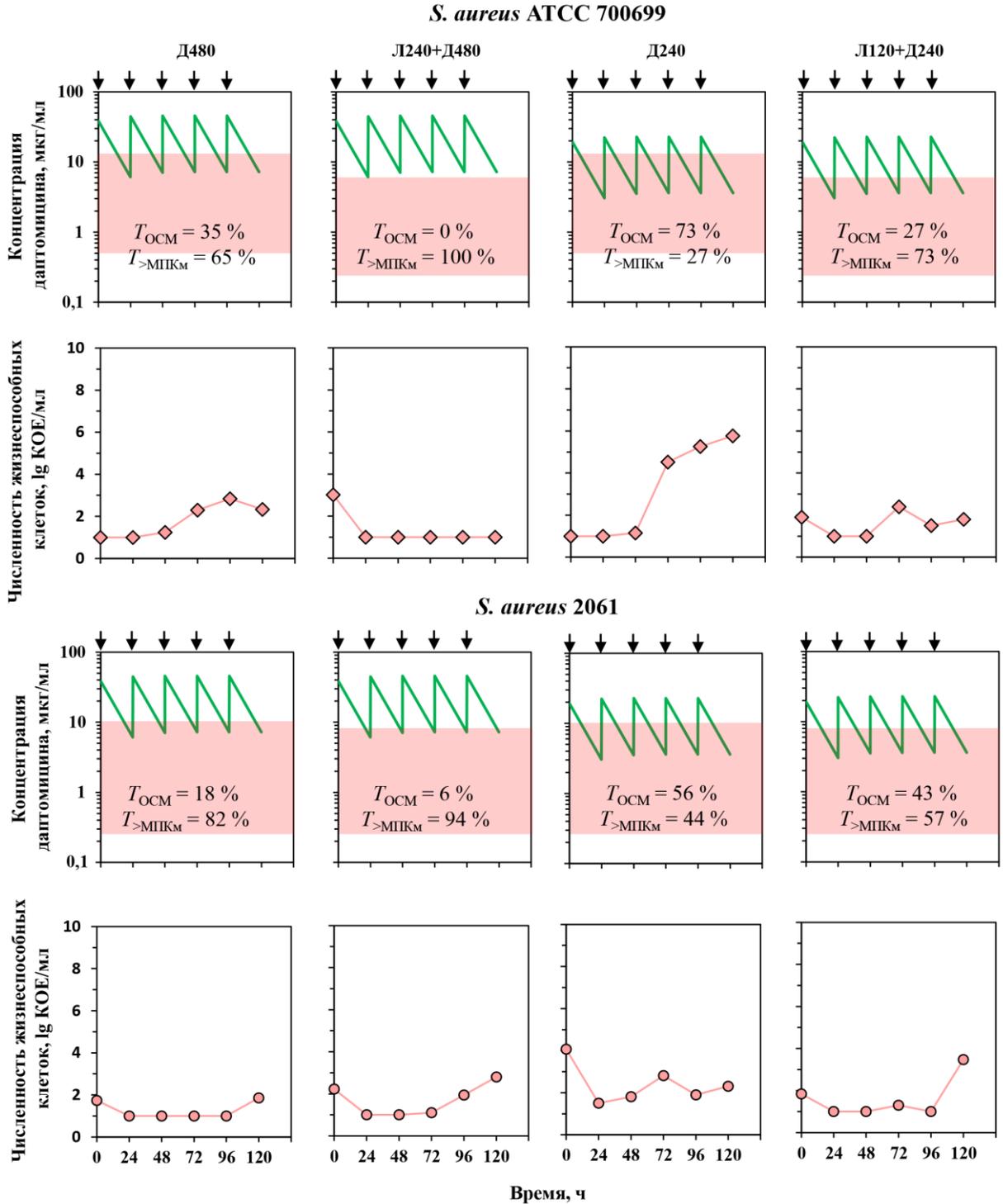


Рисунок 37. Моделируемые профили даптомицина и кинетические кривые изменения численности мутантов *S. aureus*, устойчивых 2×МПК даптомицина при моделируемых терапевтических и субтерапевтических значениях ПФК при отсутствии и в присутствии линезолида. ОСМ обозначены закрашенными областями.

Как видно на Рисунке 37, при моделировании терапевтического режима дозирования бóльшая часть фармакокинетического профиля даптомицина находилась над уровнем его МПК_М ($T_{\text{ОСМ}} = 35$ и 18% , $T_{>\text{МПКМ}} = 65$ и 82% в отношении *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061, соответственно), и рост даптомициноустойчивых мутантов был слабым (до $2,3-2,8$ lg КОЕ/мл (*S. aureus* ATCC 700699) или не наблюдался вовсе (*S. aureus* 2061). При моделировании субтерапевтического режима дозирования даптомицина наблюдали выраженное (до $5,8$ lg КОЕ/мл по окончании наблюдения) и незначительное (не более чем до $2,8$ lg КОЕ/мл в интервале 24-120 ч) увеличение численности устойчивых клеток *S. aureus* ATCC 700699 ($T_{\text{ОСМ}} = 73$, $T_{>\text{МПКМ}} = 27\%$) и *S. aureus* 2061 ($T_{\text{ОСМ}} = 56$, $T_{>\text{МПКМ}} = 44\%$), соответственно. Под влиянием линезолида время, в течение которого уровни даптомицина находились внутри ОСМ, сокращалось, а значения $T_{>\text{МПКМ}}$ увеличивались до 100% (*S. aureus* ATCC 700699) и 94% (*S. aureus* 2061) при моделировании терапевтического, и соответственно до 73 и 57% при моделировании субтерапевтического режима дозирования. Численность даптомициноустойчивых мутантов под воздействием комбинаций не превышала $3,5$ lg КОЕ/мл после начала введения препаратов, рост устойчивых клеток *S. aureus* ATCC 700699 полностью подавлялся при значениях ПФК, соответствующих терапевтическим.

Кинетические кривые изменения численности мутантов *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061, устойчивых к $2\times$ и $4\times$ МПК линезолида, практически совпадали, а обогащение популяций обоих штаммов стафилококками, устойчивыми к $4\times$ МПК даптомицина, было минимальным или отсутствовало вовсе (Приложение 4 и Приложение 5).

С целью установления зависимости «антимутантного» эффекта от $T_{>\text{МПКМ}}$ были рассчитаны значения интегрального параметра ППК_М для каждой кинетической кривой, отражающей изменения численности устойчивых стафилококков во времени. Как видно на Рисунке 38, при моделировании терапевтических режимов комбинированного применения препаратов

величина $ППК_{М}$, характеризующая численность устойчивых к линезолиду мутантов ($ППК_{М(Л)}$) штаммов *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061, снижалась с 256 до 14 и с 212 до 0 lg КОЕ/мл, соответственно. При этом соответствующие значения $T_{>МПКМ}$ возрастали на 53 и 50%. Аналогичные результаты были получены при моделировании субтерапевтических режимов дозирования. Хотя значения $ППК_{М(Л)}$ при применении линезолида в отдельности были в 2-3 раза выше, чем при моделируемых терапевтических режимах, под действием даптомицина они снизились до нуля вследствие возрастания $T_{>МПКМ}$ с 0 до 84% и 63% для *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061, соответственно.

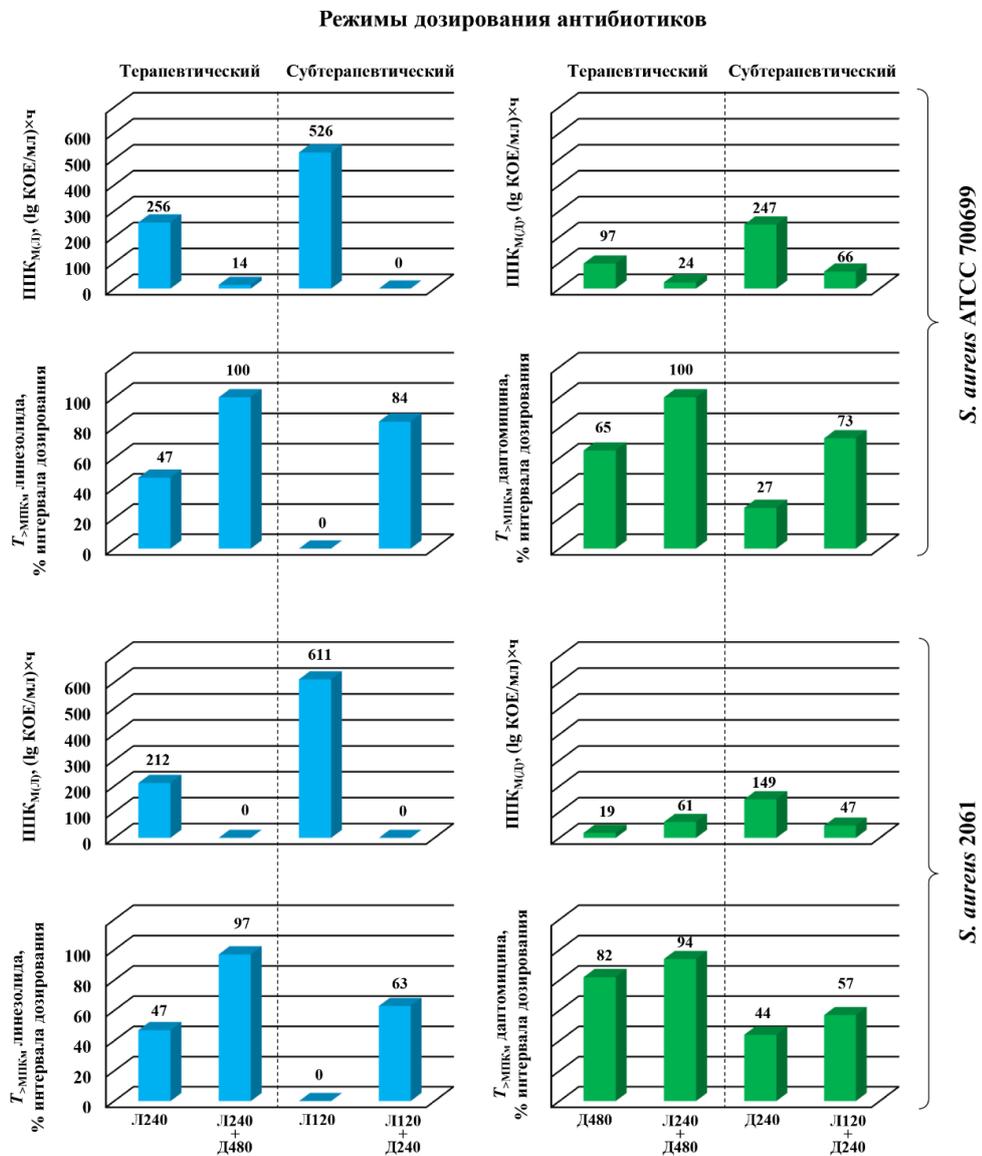


Рисунок 38. Значения $ППК_{М}$ для мутантов *S. aureus*, устойчивых к $2 \times МПК$ линезолида и даптомицина, и соответствующие значения $T_{>МПКМ}$.

Значения $ППК_M$, характеризующих численность даптомициноустойчивых мутантов ($ППК_{M(D)}$), были ниже по сравнению с $ППК_{M(L)}$ при каждом режиме дозирования, и их изменения под действием комбинации были выражены слабее. Так, при моделировании терапевтических режимов дозирования, значение $ППК_{M(D)}$ для штамма *S. aureus* ATCC 700699 в присутствии линезолида снижалось с 97 до 24 lg КОЕ/мл, а для штамма *S. aureus* 2061 даже повышалось с 19 до 61 lg КОЕ/мл при увеличении $T_{>МПК_M}$ даптомицина на 35 и 12%, соответственно. При моделируемой комбинированной терапии субтерапевтическими дозами, значения $ППК_{M(D)}$ для тех же штаммов снижались с 247 до 66 и 149 до 47 lg КОЕ/мл, соответственно, а соответствующие значения $T_{>МПК_M}$ даптомицина возрастали на 46 и 13%. Присутствие второго антибиотика в 7 из 8 случаев приводило к снижению $ППК_M$ для стафилококков, обусловленному возрастанием $T_{>МПК_M}$.

Проведенный анализ свидетельствует о чёткой зависимости «антимутантного» эффекта от значения параметра $T_{>МПК_M}$, который является надежным предиктором развития резистентности *S. aureus*. Именно поэтому использование более универсального предиктора резистентности – интегрального параметра $ПОМПК_M$ не дало преимуществ перед использованием $T_{>МПК_M}$. Действительно, снижение $ППК_M$ согласовывалось как с увеличением $T_{>МПК_M}$, так и с увеличением $ПОМПК_M$ (Рисунок 39). Например, при моделируемых терапевтических режимах дозирования препаратов снижение $ППК_{M(L)}$ под влиянием даптомицина было обусловлено повышением значений $ПОМПК_M$ линезолида с 9 до 177 мкг×ч/мл (*S. aureus* ATCC 700699) и до 153 мкг×ч/мл (*S. aureus* 2061). Снижение $ППК_{M(L)}$ для *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061, подвергнутых одновременному воздействию линезолида и даптомицина в дозах, соответствующих субтерапевтическим, явилось следствием изменения отрицательных значений $ПОМПК_M$ на положительные (с -116 до 52 и 28 мкг×ч/мл, соответственно).

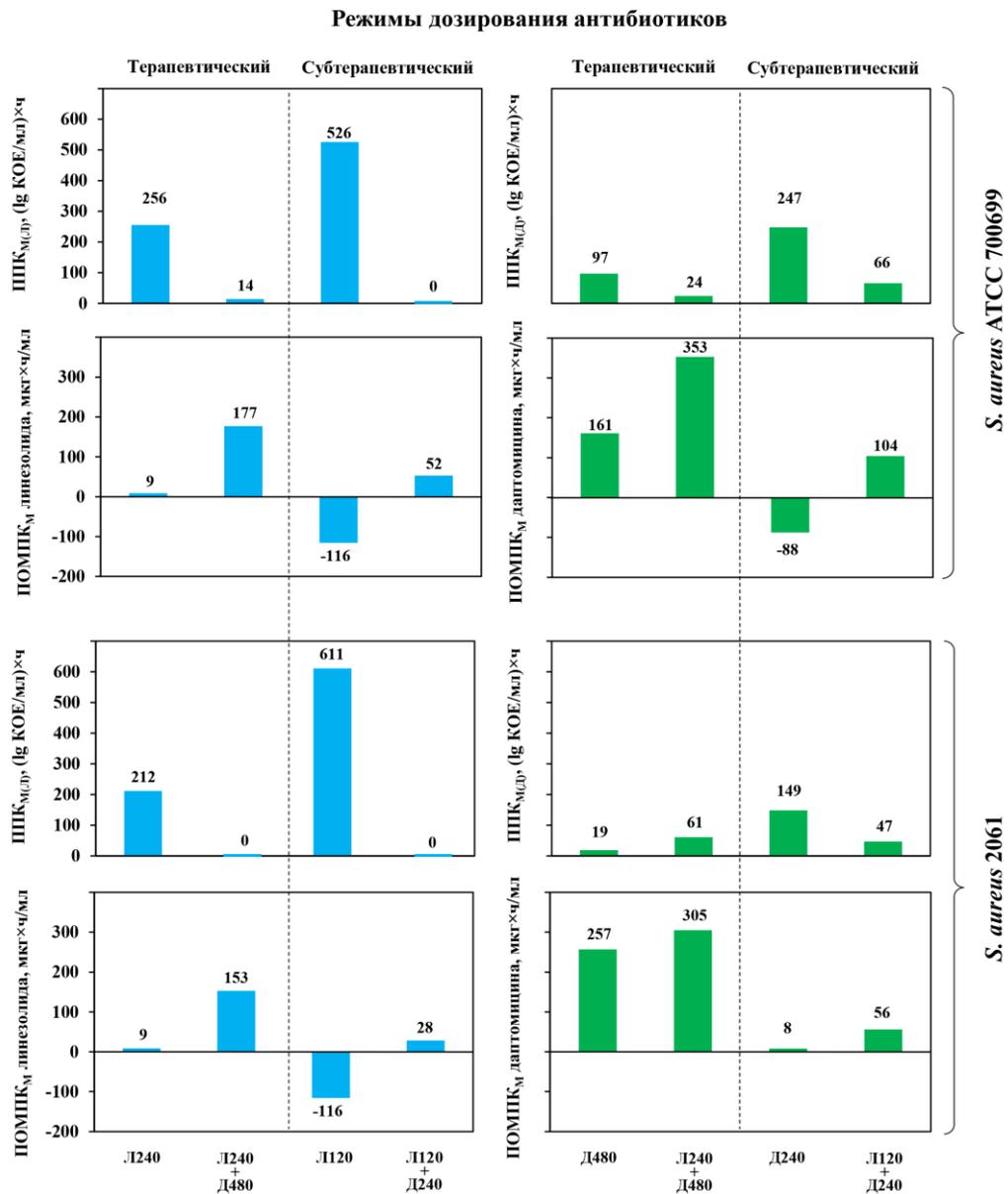


Рисунок 39. Значения ППК_М для мутантов *S. aureus*, устойчивых к 2×МПК линезолида и даптомицина, и соответствующие значения ПОМПК_М.

Подобным образом, использование комбинации даптомицина и линезолида в дозах, соответствующих терапевтическим, приводило к уменьшению ППК_{М(Д)}, обусловленному повышением значений ПОМПК_М даптомицина в отношении *S. aureus* ATCC 700699 (с 161 до 353 мкг×ч/мл), но не *S. aureus* 2061, для которого ПОМПК_М почти не менялся (257-305 мкг×ч/мл). При моделировании субтерапевтических режимов дозирования повышение ПОМПК_М даптомицина от -88 до 104 мкг×ч/мл (*S. aureus* ATCC

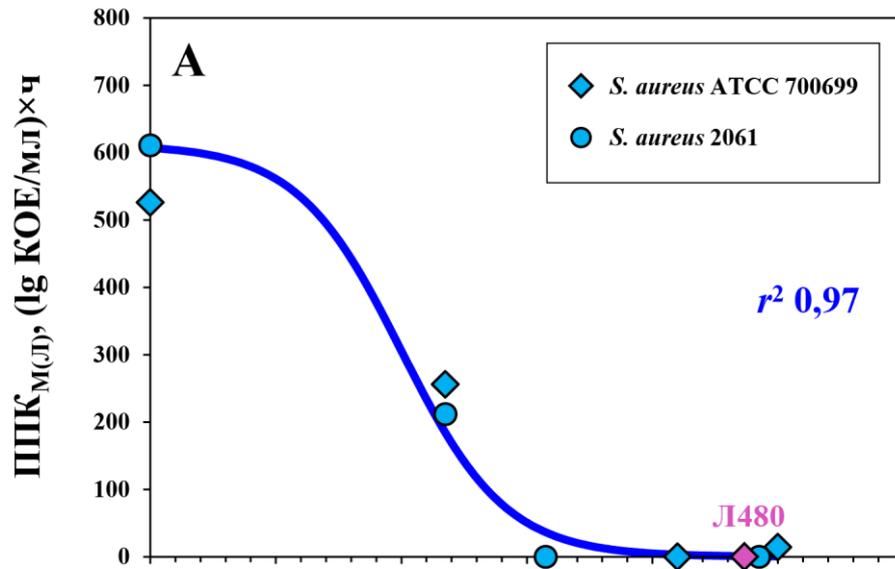
700699) и от 8 до 56 мкг×ч/мл (*S. aureus* 2061) сопровождалось значительным уменьшением ППК_{М(Д)}.

Примечательно, что наиболее выраженное снижение как ППК_{М(Л)}, так и ППК_{М(Д)} было обусловлено увеличением ПОМПК_М, сопровождаемым изменением её значения с отрицательного на положительное.

С целью оценки прогностической ценности параметров $T_{>МПКМ}$ и ПОМПК_М как штаммнезависимых предикторов «антимутантного» эффекта их значения были сопоставлены с величиной ППК_{М(Л)} или ППК_{М(Д)} для *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061 при использовании антибиотиков отдельно и в комбинации. Как видно на Рисунке 40, по мере повышения $T_{>МПКМ}$ происходит систематическое снижение ППК_{М(Л)} или ППК_{М(Д)}. Расположение точек на графике зависимости ППК_{М(Л)} от $T_{>МПКМ}$ позволяет описать её сигмоидной функцией (Уравнение 19) с высоким значением r^2 (0,97). Этой же функцией можно описать зависимость ППК_{М(Д)} от $T_{>МПКМ}$, и рассматривать полученную кривую как фрагмент нисходящей ветви сигмоиды ($r^2 = 0,78$). Форма кривых зависимости ППК_{М(Л)} и ППК_{М(Д)} от ПОМПК_М была аналогична описанной для $T_{>МПКМ}$ (Рисунок 41).

Знание зависимости ППК_{М(Л)} или ППК_{М(Д)} от $T_{>МПКМ}$ и ПОМПК_М позволяет прогнозировать «антимутантные» значения $T_{>МПКМ}$ и ПОМПК_М, которые составили, соответственно, 60% от интервала дозирования линезолида и даптомицина и 80 мкг×ч/мл. Примечательно, что подавление роста устойчивых к линезолиду мутантов *S. aureus* ATCC 700699 при «антимутантных» значениях $T_{>МПКМ}$ и ПОМПК_М линезолида, применяемого в комбинации с даптомицином, оказалось таким же, как при удвоении дозы линезолида при моделируемой монотерапии (ПФК = 480 мкг×ч/мл).

Линезолид



Даптомицин

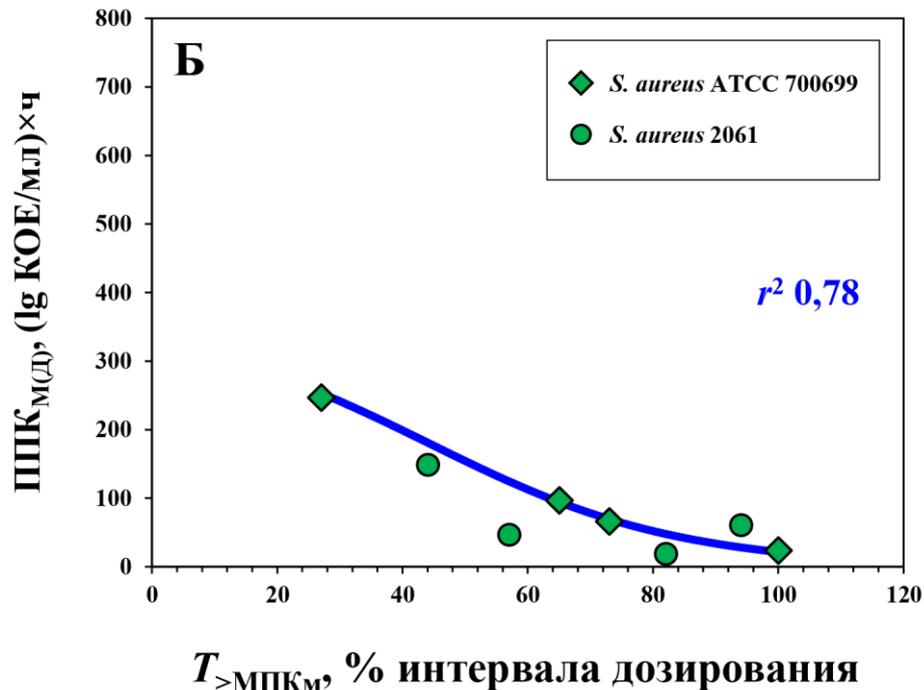
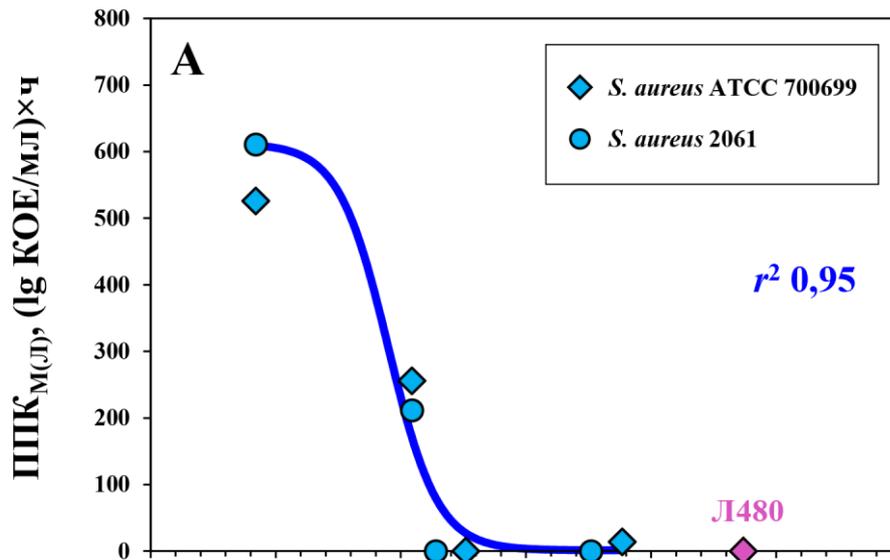


Рисунок 40. Зависимости ППК_{М(Л)} и ППК_{М(Д)} от $T_{>МПКМ}$ для мутантов, устойчивых к 2×МПК антибиотика (объединённые данные по двум штаммам *S. aureus*), описываемые Уравнением 19: $Y_0 = 0$, $x_0 = 39,964$, $a = 610,999$, $b = -8,330$ (А); $Y_0 = 0$, $x_0 = 44,229$, $a = 359,042$, $b = -20,00$ (Б). Точка Л480 – значение $T_{>МПКМ}$ при «антимутантном» режиме дозирования линезолида при моделируемой монотерапии.

Линезолид



Даптомицин

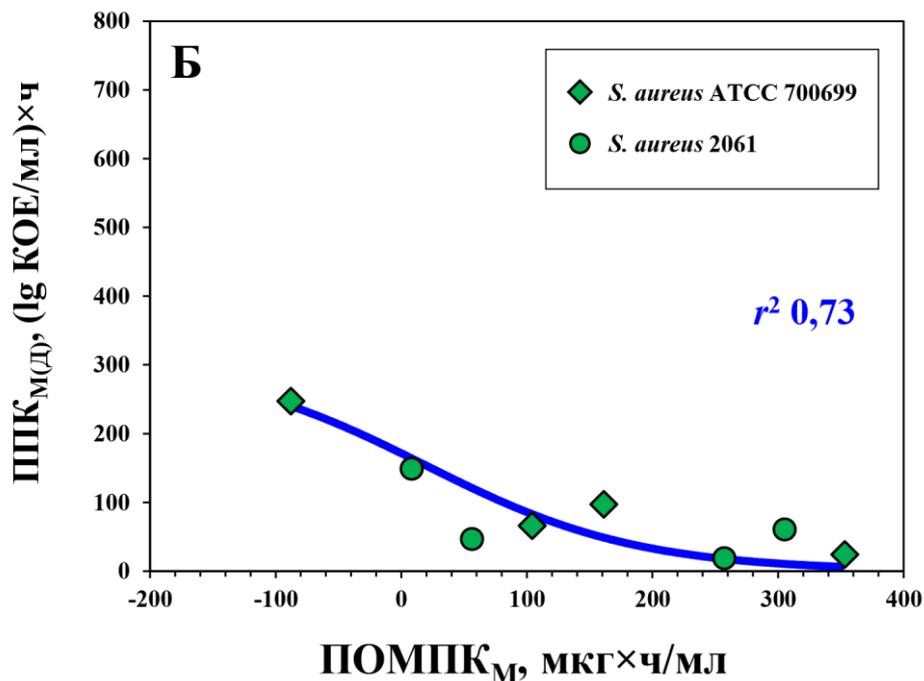


Рисунок 41. Зависимости ППК_{M(Л)} и ППК_{M(Д)} от ПомПК_M для мутантов, устойчивых к 2×МПК антибиотика (объединённые данные по двум штаммам *S. aureus*), описываемые Уравнением 19: $Y_0 = 0$, $x_0 = -9,778$, $a = 610,999$, $b = -19,837$ (А); $Y_0 = 0$, $x_0 = 18,555$, $a = 308,510$, $b = -85,00$ (Б). Точка Л480 – значение ПомПК_M при «антимутантном» режиме дозирования линезолида при моделируемой монотерапии.

4.3 Фармакодинамика линезолида, даптомицина и их комбинации в отношении общей популяции *S. aureus*

Как было отмечено в обзоре литературы (Глава 1, раздел 1.4), комбинированное применение антибиотиков может значительно снижать их воздействие на общую популяцию бактерий, даже на фоне усиления «антимутантного» эффекта. В связи с этим было проведено сравнительное исследование кинетики изменения численности общей популяции *S. aureus* под воздействием линезолида и даптомицина и их комбинаций.

Как видно на Рисунке 42, эффект комбинации в отношении *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061 при обоих моделируемых режимах дозирования был выше эффекта линезолида. Во всех случаях кинетические кривые, полученные при моделировании комбинированной терапии, располагаются ниже кривых, полученных при использовании линезолида отдельно. При этом гибель стафилококков происходит быстрее, и плотность их популяции не возвращается к исходной по окончании наблюдения. Например, под одновременным воздействием терапевтически реализуемых доз линезолида и даптомицина численность клеток *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061 достигала минимума через 6 ч, сокращаясь на 4,8 и 4,6 lg КОЕ/мл, соответственно, что на 18-30 ч раньше и на 2,2-2,5 порядка интенсивнее, чем под воздействием линезолида в тех же дозах.

Кинетические кривые для каждого штамма, полученные при моделировании субтерапевтических режимов комбинированного введения линезолида с даптомицином, а также для штамма *S. aureus* ATCC 700699 при моделировании монотерапии линезолидом, схожи по форме и расположению с описанными выше кривыми для моделируемых терапевтических режимов. Вместе с тем, введение одного линезолида в дозе, соответствующей субтерапевтической, минимально снижало численность клеток *S. aureus* 2061, которая превысила исходную величину через 72 ч после начала моделируемой терапии в результате вторичного роста. При моделировании

субтерапевтических режимов дозирования, плотность популяции *S. aureus* ATCC 700699 снижалась на 2,7 lg КОЕ/мл под воздействием линезолида, а под воздействием комбинации – на 4,2 lg КОЕ/мл (на 1,5 порядка интенсивнее). В тех же условиях численность клеток *S. aureus* 2061 снижалась на 0,9 и 4,9 lg КОЕ/мл при моделировании монотерапии линезолидом и комбинированной терапии, соответственно (различие на 4 порядка).

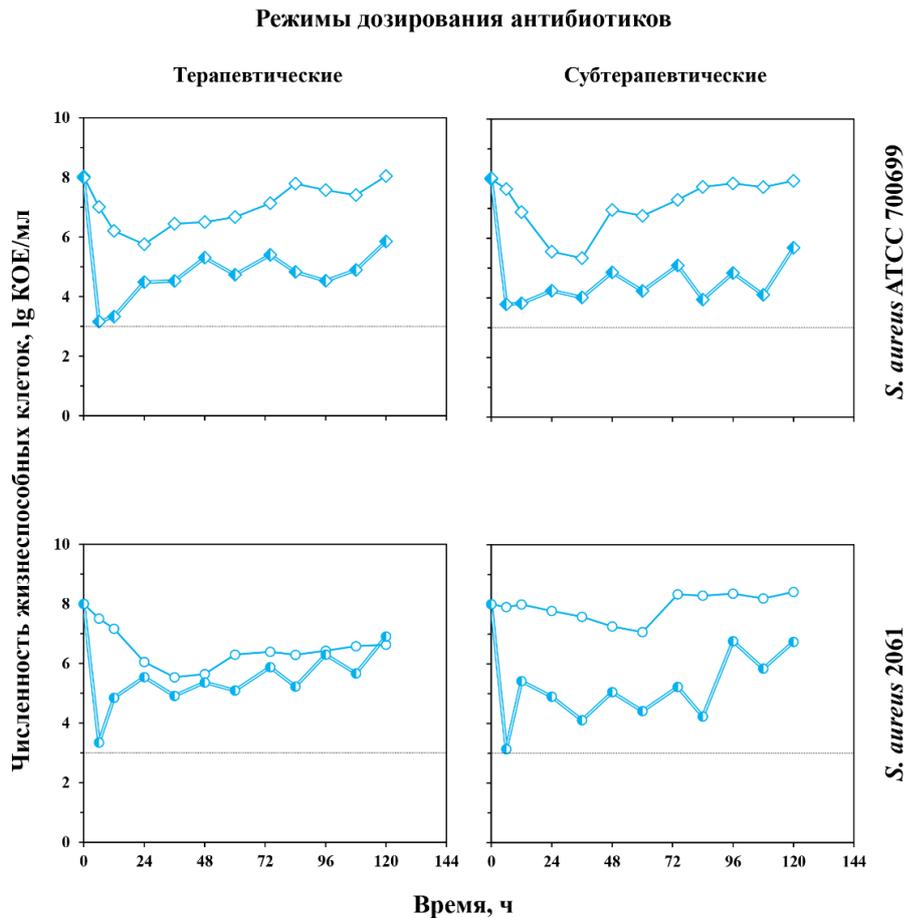


Рисунок 42. Кинетические кривые изменения численности общей популяции клеток *S. aureus* при моделируемых терапевтических и субтерапевтических значениях ПФК линезолида в отсутствие (одиночные линии и белые маркеры) и в присутствии (двойные линии и двухцветные маркеры) даптомицина. Нижний предел определения обозначен пунктирной линией.

Так же, как и при изучении устойчивой субпопуляции, результаты экспериментов с линезолидом при моделировании его монотерапии в отношении общей популяции *S. aureus* ATCC 700699 качественно и количественно совпадают с результатами, описанными в предыдущей главе.

В отличие от линезолида, даптомицин оказывал бактерицидное действие на оба штамма *S. aureus* при моделировании как терапевтических, так и субтерапевтических режимов его дозирования. Эффект комбинации линезолида с даптомицином в отношении обоих штаммов *S. aureus* при режимах Л240+Д480 и Л120+Д240 на протяжении всего периода наблюдения был схожим с эффектом липопептида в отдельности при режимах Д240 и Д480, соответственно. При моделировании как монотерапии даптомицином, так и комбинированной терапии, численность стафилококков резко снижалась до значения, близкого к или равного пределу определения, а затем наблюдался постепенный вторичный рост (Рисунок 43).

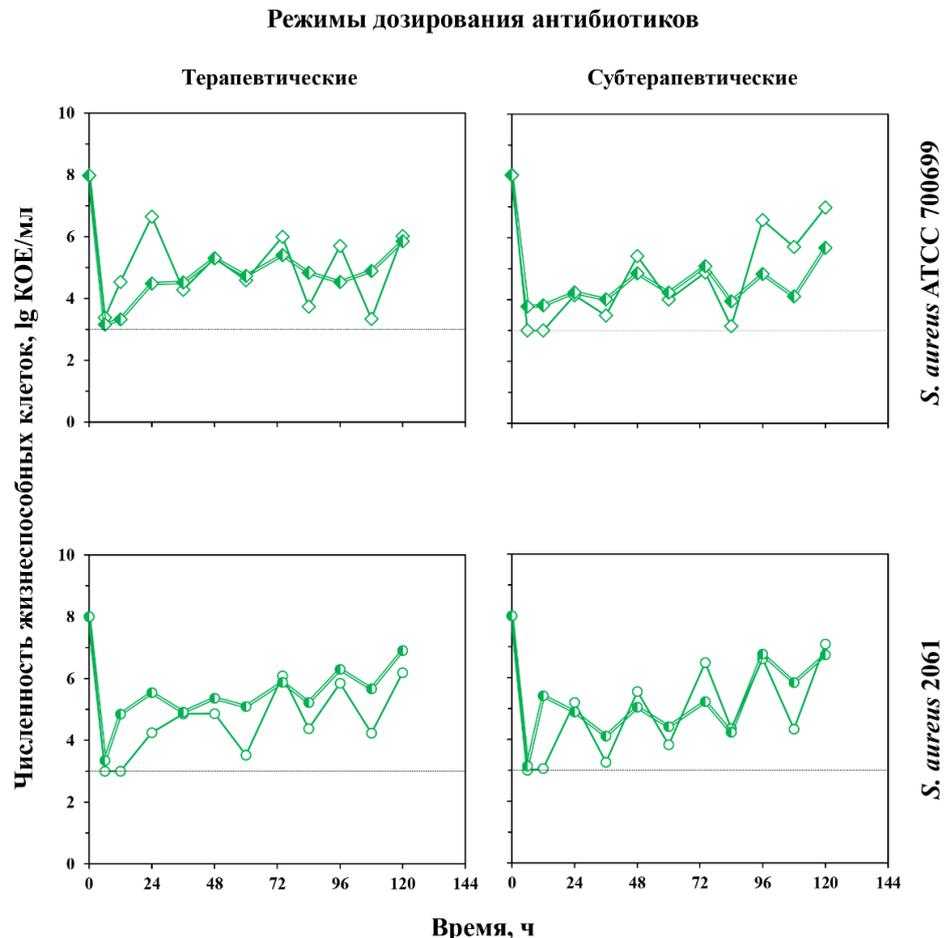


Рисунок 43. Кинетические кривые изменения численности общей популяции клеток *S. aureus* при моделируемых терапевтических и субтерапевтических значениях ПФК даптомицина в отсутствие (одиночные линии и белые маркеры) и в присутствии (двойные линии и двухцветные маркеры) линезолида. Нижний предел определения обозначен пунктирной линией.

Описанные различия в антистафилококковом эффекте линезолида, даптомицина и их комбинации становятся очевидными при интегральной оценке кинетических кривых с помощью параметра ППК (обратная мера эффекта). Как видно на Рисунке 44, противостафилококковый эффект комбинации в среднем в 2,2 раза выше эффекта линезолида и практически не отличается от эффекта даптомицина. По-видимому, эти различия обусловлены значительно бóльшим снижением МПК линезолида под влиянием даптомицина (16-кратные различия) по сравнению с минимальным снижением МПК даптомицина под влиянием линезолида (2-кратное различие для *S. aureus* ATCC 700699 при отсутствии различий в МПК для *S. aureus* 2061).

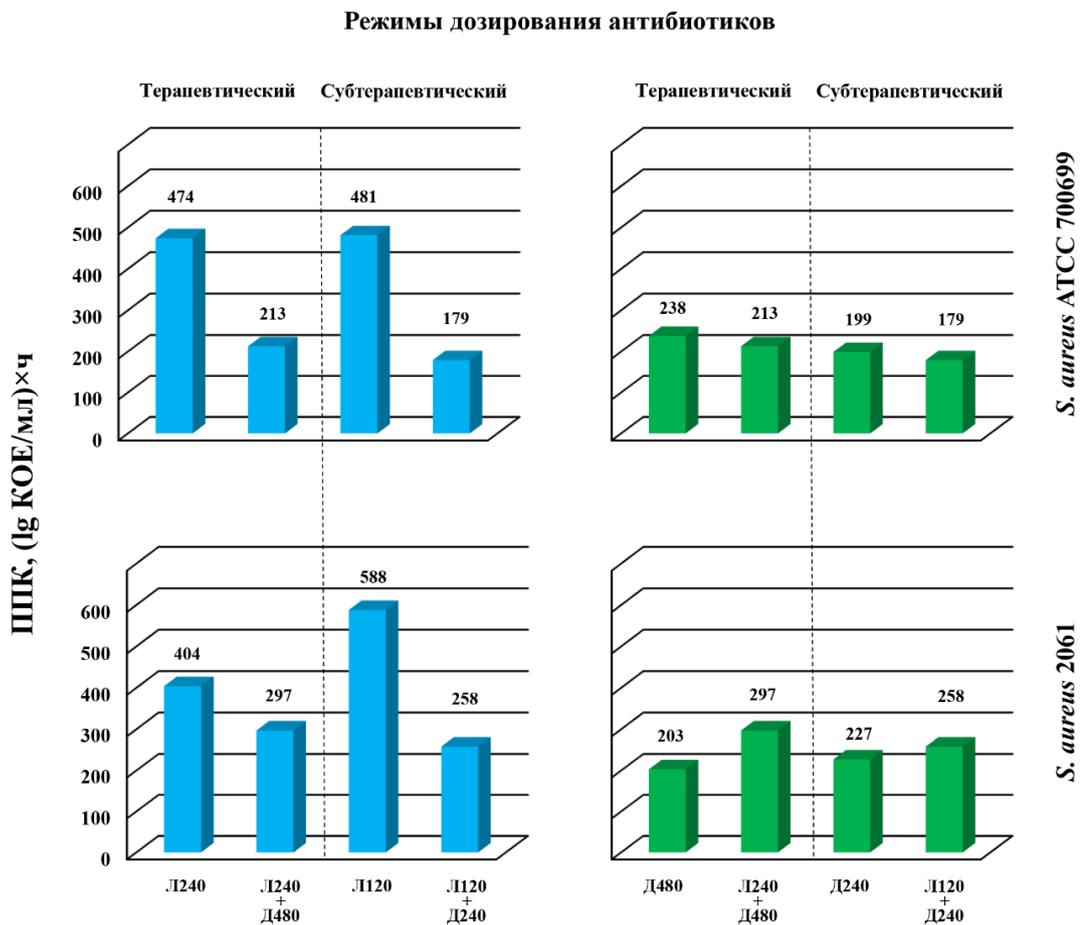


Рисунок 44. Значения ППК общей популяции *S. aureus* под действием антибиотиков в отсутствие и в присутствии друг друга при моделируемых терапевтических и субтерапевтических значениях ПФК (цифры рядом с аббревиатурами антибиотиков; в мкг×ч/мл).

Результаты исследования фармакодинамики линезолида, даптомицина и их комбинации в отношении общей популяции и резистентных субпопуляций штаммов *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061 показали следующее.

Во-первых, совместное применение линезолида и даптомицина приводит к снижению значений их MPK_M в отношении стафилококка. Вследствие этого увеличиваются значения $T_{>MPK_M}$ и $ПОМПК_M$ обоих препаратов при моделировании терапевтических или субтерапевтических режимов комбинированной терапии, что приводит к снижению риска развития резистентности к ним у *S. aureus*.

Во-вторых, комбинация линезолида и даптомицина характеризуется высоким «антимутантным» эффектом в отношении *S. aureus*, но в отношении общей популяции золотистого стафилококка её эффект сопоставим с таковым даптомицина.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Антимикробный эффект линезолида в отношении общей популяции стафилококков был слабовыраженным и зависел от режима его дозирования. Фармакодинамика оксазолидинона в отношении трёх изученных штаммов *S. aureus* была качественно схожей. Между ППК (объединённые данные по всем штаммам) и ПФК/МПК была установлена зависимость, описываемая сигмоидной функцией ($r^2 = 0,82$). Аналогичные зависимости для пары «линезолид – *S. aureus*», были ранее установлены между интегральными параметрами I_E или ПМК и ПФК/МПК (Strukova et al., 2009). Сигмоидные зависимости между параметром, отражающим антибактериальный эффект, и ПФК/МПК прежде были установлены для многих пар антибиотик-бактерия (Firsov et al., 1997, 2000a, 2001, 2002a, 2002b, 2003, 2006, 2013; MacGowan et al., 2000, 2001; Klepser et al., 2001; Lubenko et al., 2008; Strukova et al., 2016a, 2016b).

Значительная часть настоящей работы была посвящена изучению закономерностей развития резистентности *S. aureus* к линезолиду. Настоящее исследование стало логическим продолжением проведённого нашей группой исследования, результаты которого представлены в диссертационной работе Струковой Е. Н. (Струкова, 2010) и научной статье (Firsov et al., 2015b).

Авторы упомянутого исследования приняли во внимание то обстоятельство, что крайне низкая частота мутаций, приводящих к развитию резистентности *S. aureus* к линезолиду (Miller et al., 2008; Clark et al., 2009; Locke et al., 2009b), может обуславливать отсутствие развития резистентности *S. aureus* к линезолиду в условиях динамической системы *in vitro* (Cha et al., 2003, LaPlante, Rybak, 2004, Smirnova et al., 2006, Va et al., 2010). Разработанный метод искусственного обогащения бактериальной популяции стафилококка устойчивыми клетками позволил изучить развитие резистентности к линезолиду у штаммов *S. aureus* (Firsov et al., 2015b, 2017; Zinner et al., 2018), в том числе при его сочетанном применении с

рифампицином (Firsov et al., 2017) и гентамицином (Zinner et al., 2018). Данный метод успешно применили и в настоящем исследовании. Мутанты золотистого стафилококка, полученные путём лабораторной селекции в среде с линезолидом и используемые для обогащения исходного инокулята *S. aureus* устойчивыми клетками, для двух штаммов характеризовались наличием хромосомной мутации – нуклеотидной замены G2576T. Резистентные мутанты стафилококка, выделяемые из динамической системы в процессе эксперимента, также характеризовались наличием данной хромосомной мутации. Согласно литературным данным, данная замена является классической мутацией, обуславливающей устойчивость к линезолиду у грамположительных микроорганизмов, и часто обнаруживается у выделенных в клинике стафилококков, устойчивых к линезолиду (Tsiodras et al., 2001; Johnson et al., 2002; Auckland et al., 2002; Wilson et al., 2003; Meka et al., 2004b; Burlison et al., 2004; Halle et al., 2004; Dibo et al., 2004; Gales et al., 2006; Bonora et al., 2006; Hentschke et al., 2007; Yoshida et al., 2009; Hill et al., 2010; Vena et al., 2013; Gu et al., 2013; de Almeida et al., 2014; Yu et al., 2014).

По результатам упомянутой работы (Струкова, 2010; Firsov et al., 2015b) была установлена применимость гипотезы ОСМ к линезолиду и сделано предположение о существовании зависимостей между селекцией устойчивых к нему мутантов *S. aureus* и фармакокинетико-фармакодинамическими параметрами. Моделирование узкого диапазона значений ПФК антибиотика не дало возможности установить полноценную зависимость между резистентностью и фармакокинетико-фармакодинамическими параметрами. Также в упомянутой работе не исследовали фармакодинамику линезолида при его комбинированном применении с другими антибиотиками в отношении резистентных клеток *S. aureus*, и соответственно, не проводили поиск зависимости «антимутантного» эффекта комбинации препаратов от фармакокинетико-фармакодинамических параметров. Такие исследования были проведены в настоящей работе.

Характер изменения интенсивности селекции устойчивых мутантов *S. aureus* согласовывался с гипотезой ОСМ: чем меньше концентрация антибиотика находилась в пределах ОСМ, тем менее выраженным было развитие резистентности. Моделирование значительно более широкого диапазона значений ПФК линезолида, чем в предыдущем исследовании (Firsov et al., 2015b), позволило установить куполообразные зависимости между развитием резистентности золотистого стафилококка (данные были объединены для трёх штаммов) и параметрами ПФК/МПК или ПФК/МПК_М с высокими коэффициентами корреляции. Подобные куполообразные кривые зависимости «резистентность – концентрация», подтверждающие справедливость гипотезы ОСМ, ранее были получены для антибиотиков других классов: фторхинолонов (Firsov et al., 2003, 2013, 2014, 2015a; Zinner et al., 2003, 2013; Croisier et al., 2004; Tam et al., 2007; Gebru et al., 2011; Strukova et al., 2015, 2016b), гликопептидов (Firsov et al., 2006; Zhu et al., 2012), липопептидов (Firsov et al., 2006) и бета-лактамов (Stearne et al., 2007). Примечательно, что диапазон значений ПФК/МПК для *S. aureus* и линезолида, который соответствовал наиболее интенсивному обогащению популяции бактерий мутантами (30-60 ч), оказался схожим с таковыми для *S. aureus* в случае ванкомицина, даптомицина (20-60 ч) (Firsov et al., 2006) и фторхинолонов (24-62 ч) (Firsov et al., 2003).

Поскольку установленные в настоящем исследовании зависимости «ППК_М – ПФК/МПК» и «ППК_М – ПФК/МПК_М» оказались инвариантны относительно бактериального штамма, они были применены для последующих «антимутантных» прогнозов. Ранее уже была изучена надёжность параметров ПФК/МПК и ПФК/МПК_М как предикторов развития антибиотикорезистентности в динамических системах *in vitro* (Olofsson et al., 2006; Homma et al., 2007) (Firsov et al., 2006, 2008b, 2013; Gebru et al., 2011; Liang et al., 2011; Strukova et al., 2016a, 2016b). В ряде работ, объектами исследований в которых были фторхинолоны и грамположительные бактерии *S. pneumoniae* (Homma et al., 2007) и *S. aureus* (Firsov et al., 2008b; Liang et al.,

2011), был сделан вывод о преимуществе параметра ПФК/МПК_М перед ПФК/МПК. В то же время, в случае фторхинолонов и граммотрицательных бактерий *E. coli* (Firsov et al., 2013; Gebru et al., 2011), *Pseudomonas aeruginosa* (Strukova et al., 2016b) и *Klebsiella pneumoniae* (Strukova et al., 2016a), отмечали бóльшую надёжность параметра ПФК/МПК как предиктора развития резистентности (Firsov et al., 2013; Strukova et al., 2016b). В исследовании с ванкомицином и даптомицином и *S. aureus* корреляционную зависимость с развитием резистентности удалось установить только для параметра ПФК/МПК (Firsov et al., 2006).

Согласно результатам настоящего исследования, оба параметра, ПФК/МПК_М и ПФК/МПК, хорошо коррелировали с развитием резистентности *S. aureus* к линезолиду. Установленные по этим зависимостям пороговые «антимутантные» значения ПФК/МПК и ПФК/МПК_М антибиотика, составили около 200 и 80 ч, соответственно. Близкие к установленным «антимутантные» значения параметра ПФК/МПК были получены применительно к антибиотикам других классов: ≥ 200 ч для ванкомицина и даптомицина, 201-244 ч для фторхинолонов. В случае линезолида, его «антимутантное» значение ПФК/МПК (200 ч) примерно в два раза превышало терапевтически достижимое (120 ч) для всех изученных штаммов. Вместе с тем, к прогнозам «антимутантного» эффекта линезолида на основании зависимости «МПК_М – ПФК/МПК» стоит относиться осторожно. Дело в том, что эта зависимость была построена на основании данных, полученных для штаммов с одинаковыми значениями МПК и, следовательно, вопрос о ее применимости для прогнозирования «антимутантного» эффекта линезолида в отношении штаммов стафилококка с другими уровнями чувствительности к оксазолидинону остаётся открытым. Такой проблемы не было в случае применения в качестве предиктора резистентности параметра ПФК/МПК_М, поскольку значения МПК_М линезолида в отношении изученных штаммов стафилококка различались. Высокий коэффициент корреляции для

зависимости «ППК_М – ПФК/МПК_М» подтверждает применимость данного параметра в качестве предиктора при «антимутантных» прогнозах.

Прогнозируемое пороговое «антимутантное» значение ПФК/МПК_М в отношении *S. aureus* составило 80 ч, а спрогнозированное на его основе пороговое значение МПК_М линезолида (для терапевтической дозы 600 мг каждые 12 ч) составило 4 мкг/мл. Если штамм золотистого стафилококка, вызвавший заболевание, характеризуется значением МПК_М линезолида выше порогового, то риски развития резистентности этого штамма к линезолиду в процессе терапии могут возрасти. Значения МПК_М изученных штаммов, равные 5, 6 и 10 мкг/мл, оказались выше данного критического значения. Наибольшую «опасность» с точки зрения развития резистентности представляет штамм *S. aureus* ATCC 700699, характеризующийся высоким значением МПК_М, которое более чем в 2 раза превышает пороговое.

Помимо рассмотренных выше параметров ПФК/МПК и ПФК/МПК_М в качестве альтернативных предикторов развития резистентности бактерий к антибиотикам могут быть использованы параметры $T_{\text{ОСМ}}$ и $T_{>\text{МПК}_\text{М}}$. Как отмечалось в других работах (Firsov et al., 2008; 2014), при оценке $T_{\text{ОСМ}}$ как возможного предиктора развития резистентности следует принимать во внимание гетерогенность ОСМ. Применительно к линезолиду и стафилококкам эти утверждения также оказались справедливыми. При построении графиков зависимости ППК_М от $T_{\text{ОСМ}}$ для каждого из изученных штаммов *S. aureus* была получена петля гистерезиса, для верхней кривой которой выполняется условие $T_{>\text{МПК}_\text{М}} = 0$, а для нижней – $T_{>\text{МПК}_\text{М}} > 0$ (Рисунок 29). Данный анализ позволяет увидеть различия между значениями ППК_М, соответствующими одному и тому же значению $T_{\text{ОСМ}}$ линезолида, но относящимися к разным частям петли. Например, при $T_{\text{ОСМ}} \sim 50\%$ были зафиксированы двукратные различия в значениях ППК_М. Результаты настоящей работы подтверждают гетерогенность «окна селекции мутантов» применительно к линезолиду и стафилококкам. В этой связи прогностическая ценность параметра $T_{\text{ОСМ}}$ снижается, если для установления корреляции

использовать значения этого параметра без учёта соответствующей величины $T_{>МПКМ}$, отражающей положение фармакокинетического профиля линезолида относительно ОСМ. При $T_{>МПКМ} = 0$, концентрации антибиотика преимущественно находились в нижней части ОСМ, в то время как, при $T_{>МПКМ} > 0$, концентрации препарата большую часть времени находились в верхней части ОСМ. Учитывая разделение значений $T_{ОСМ}$ в зависимости от значения параметра $T_{>МПКМ}$, для случая, когда $T_{>МПКМ} = 0$, удалось построить зависимость «ППК_М – $T_{ОСМ}$ » с высоким коэффициентом корреляции.

При изучении прогностического потенциала параметра $T_{>МПКМ}$, было показано, что его значения согласовывались с наблюдаемым развитием резистентности *S. aureus* к линезолиду или его отсутствием: в случае селекции мутантов профили препарата не превышали уровень МПК_М ($T_{>МПКМ} = 0$), а в случае её подавления – находились выше этого уровня ($T_{>МПКМ} = 96-100\%$). Зависимость «ППК_М – $T_{>МПКМ}$ » была описана сигмоидной функцией с высоким коэффициентом корреляции. Принимая во внимание это обстоятельство, использование параметра $T_{>МПКМ}$ в качестве предиктора резистентности предпочтительнее, чем параметра $T_{ОСМ}$. Согласно зависимости «ППК_М – $T_{>МПКМ}$ » пороговое «антимутантное» значение $T_{>МПКМ}$ оказывается близким к 100%. Такие значения параметра $T_{>МПКМ}$ могут быть достигнуты при применении линезолида в терапевтической дозе только в том случае, если значение МПК_М линезолида в отношении бактериального штамма не превышает 4 мкг/мл. Пороговое значение МПК_М линезолида, согласно прогнозу на основе зависимости «ППК_М – ПФК/МПК_М», также составило 4 мкг/мл. Совпадение пороговых значений МПК_М линезолида, вычисленных при помощи параметров ПФК/МПК_М и $T_{>МПКМ}$, указывает на их равноценность в качестве предикторов «антимутантных» прогнозов. В результате проведённого сравнительного анализа наиболее перспективными для прогнозирования риска развития резистентности бактерий были признаны параметры ПФК/МПК_М и $T_{>МПКМ}$.

Один из изученных штаммов стафилококка, *S. aureus* ATCC 700699, характеризовался высоким значением МПК_М, равным 10 мкг/мл, которое более чем в 2 раза превышало пороговое. На фоне моделирования терапевтического режима дозирования линезолида популяция этого штамма обогащалась значительно бóльшим количеством мутантов, чем популяции *S. aureus* 688 и 479, значения МПК_М линезолида в отношении которых составляли 5 и 6 мкг/мл, соответственно. Следует отметить, что в исследованиях, проводимых в динамической системе, не учитывается вклад иммунного ответа организма человека, который мог бы обеспечить гибель мутантных клеток в случае их слабого роста. В то же время, если инфекция будет вызвана штаммом, характеризующимся таким же значением МПК_М, как у *S. aureus* ATCC 700699, или выше, то риск развития резистентности при терапевтических уровнях концентрации линезолида может быть высоким. Применительно к таким штаммам стоит рассматривать альтернативные варианты борьбы с устойчивостью, в частности, комбинированное применение антибиотиков.

«Антимутантный» эффект линезолида и даптомицина в отношении *S. aureus* при их сочетанном применении с препаратами других классов ранее изучали для пар линезолид-рифампицин (Firsov et al., 2017), линезолид-гентамицин (Zinner et al., 2018) и даптомицин-рифампицин (Golikova et al., 2019). Согласно результатам настоящего исследования, гипотеза ОСМ применима к паре «линезолид – *S. aureus*», а результаты перечисленных исследований показали, что гипотеза ОСМ также может быть распространена и на комбинации антибиотиков. Развитие резистентности золотистого стафилококка к антибиотикам в комбинациях удавалось прогнозировать при помощи фармакокинетико-фармакодинамического параметра $T_{>МПКМ}$ (Firsov et al., 2017; Zinner et al., 2018) или ПОМПК_М (Golikova et al., 2019). В каждом из перечисленных исследований применяли фармакокинетически-обоснованный подход к прогнозированию развития резистентности бактерий на фоне

применения комбинированной антибиотикотерапии: оценку значений MPK_M антибиотиков, применяемых в комбинации, проводили при соотношении концентраций препаратов, соответствующем соотношению значений ПФК антибиотиков, моделируемых в фармакодинамических экспериментах (см. Главу 1, Раздел 1.4). Применимость этого подхода была оценена в настоящем исследовании при изучении «антимутантного» эффекта комбинации линезолид-даптомицин в отношении *S. aureus*.

На фоне моделируемой монотерапии линезолидом или даптомицином как при субтерапевтических, так и при терапевтических значениях ПФК, наблюдалось обогащение популяции обоих штаммов стафилококка мутантами, устойчивыми к линезолиду и даптомицину. Когда антибиотики применялись в комбинации, наблюдалось полное или частичное подавление роста устойчивых клеток стафилококка к линезолиду или даптомицину, соответственно. Усиление «антимутантного» эффекта антибиотиков, применяемых в комбинации, удалось объяснить снижением значений их MPK_M в присутствии друг друга. Так, под влиянием даптомицина значения MPK_M линезолида в отношении штаммов *S. aureus* ATCC 700699 и *S. aureus* 2061 снизились в 3,3 и 2,5 раза, соответственно, а значения MPK_M даптомицина под влиянием линезолида снизились в 2,3 и 1,3 раза, соответственно. Указанное снижение значений MPK_M линезолида в присутствии даптомицина увеличивало длительность пребывания профиля препарата над верхней границей ОСМ в экспериментах с комбинацией антибиотиков: в зависимости от штамма и режима дозирования значения $T_{>MPK_M}$ возрастали с 0-47% до 63-100%. Под влиянием линезолида значения MPK_M даптомицина снижались, а значения $T_{>MPK_M}$ – увеличивались с 27-82% до 57-100%.

Сопоставление значений интегральных параметров $ППК_{M(L)}$ и $ППК_{M(D)}$ и соответствующих значений $T_{>MPK_M}$ для линезолида и даптомицина в случае обоих штаммов показало чёткую зависимость «антимутантного» эффекта

антибиотиков от продолжительности превышения их профилями уровня МПК_М. Присутствие даптомицина во всех случаях приводило к снижению значений ППК_{М(Л)}, обусловленному возрастанием значений $T_{>МПКМ}$. Так, при моделировании терапевтического и субтерапевтического режима дозирования линезолида значения ППК_{М(Л)} резко снижались вплоть до нуля при возрастании $T_{>МПКМ}$ для линезолида на 50% и более под влиянием даптомицина. Аналогичные изменения в значениях ППК_{М(Л)}, связанные с увеличением $T_{>МПКМ}$, наблюдались для даптомицина под действием линезолида, однако они были менее выражены, особенно при моделировании терапевтических режимов дозирования.

В настоящей работе было показано соответствие между снижением значений МПК_М антибиотиков под влиянием друг друга, повышением значений $T_{>МПКМ}$ препаратов при их применении в комбинации в фармакодинамических экспериментах и усилением «антимутантного» эффекта. Как было отмечено ранее, такие же результаты были получены для пар линезолид-рифампицин (Firsov et al., 2017) и линезолид-гентамицин (Zinner et al., 2018). В обеих работах воздействие комбинации полностью подавляло селекцию устойчивых к линезолиду мутантов, как при моделируемых терапевтических, так и при субтерапевтических режимах дозирования. Сочетание с оксазолидиноном, в свою очередь, снижало интенсивность роста клеток, устойчивых к рифампицину, по сравнению с их ростом, наблюдаемым при моделируемой монотерапии данным препаратом. То же было справедливо и для комбинации линезолид-гентамицин. Таким образом, результаты трёх работ, включая настоящую, позволяют утверждать, что усиление «антимутантного» эффекта антибиотиков при их сочетанном применении в отношении *S. aureus* связано с увеличением времени, в течение которого концентрации препаратов превышали МПК_М. Сказанное подтверждает применимость фармакокинетически-обоснованного подхода к прогнозированию «антимутантного» эффекта комбинированной антибиотикотерапии.

Наряду с оценкой параметра $T_{>МПКМ}$ в качестве предиктора «антимутантного» эффекта комбинаций антибиотиков, развитие резистентности *S. aureus* ($ППК_{М(Л)}$ и $ППК_{М(Д)}$) также соотносили с новым интегральным параметром $ПОМПК_{М}$. Этот параметр отражает длительность пребывания профиля антибиотика как ниже уровня $МПК_{М}$, так и над ним (Рисунок 15). Подобно наблюдаемому возрастанию эффекта с увеличением параметра $T_{>МПКМ}$, усиление «антимутантного» эффекта обоих антибиотиков согласовывалось с увеличением соответствующего значения $ПОМПК_{М}$. Наиболее выраженное снижение как значений $ППК_{М(Л)}$, так и $ППК_{М(Д)}$ согласовывалось с наибольшим возрастанием значений $ПОМПК_{М}$. Параметр $ПОМПК_{М}$ впервые был предложен при исследовании фармакодинамики комбинации даптомицина с рифампицином в отношении *S. aureus*, и была показана его надёжность как предиктора развития резистентности золотистого стафилококка (Golikova et al., 2019). Необходимость использования параметра $ПОМПК_{М}$ была обусловлена невозможностью сопоставления значений $ППК_{М}$ с соответствующими значениями $T_{>МПКМ}$, поскольку уровни концентрации препаратов при моделировании моно- и комбинированной терапии не достигали $МПК_{М}$ ($T_{>МПКМ} = 0$). В настоящей работе, в отличие от упомянутой выше, значения $T_{>МПКМ}$ в большей части случаев были выше нуля и различались для линезолида и даптомицина при их применении по отдельности или в комбинации. В данной работе мы подтвердили возможность применения параметра $ПОМПК_{М}$ в качестве предиктора развития резистентности *S. aureus* к комбинации линезолид-даптомицин.

Как показал регрессионный анализ, параметры $T_{>МПКМ}$ и $ПОМПК_{М}$ являются надёжными предикторами «антимутантного» эффекта комбинации линезолида с даптомицином в отношении *S. aureus*: была установлена сигмоидная зависимость между $ППК_{М(Л)}$ или $ППК_{М(Д)}$ и параметром $T_{>МПКМ}$ ($r^2 = 0,97$ или $0,78$, соответственно) или $ПОМПК_{М}$ ($r^2 = 0,95$ или $0,73$, соответственно).

Что касается фармакодинамики линезолида, даптомицина и их комбинации в отношении общей популяции *S. aureus*, то было отмечено усиление антистафилококкового эффекта комбинации по сравнению с линезолидом, но не с даптомицином. Предположительно, различия между эффектом каждого из препаратов в отдельности и в комбинации можно объяснить снижением значений МПК антибиотиков в присутствии друг друга. Так же, как и в случае с оценкой значений МПК_М линезолида и даптомицина в присутствии друг друга, значения МПК антибиотиков в комбинации оценивали, используя фармакокинетически обоснованный подход. В результате, значения МПК линезолида в комбинации снижались 16-кратно в случае обоих штаммов, соответствующее значение МПК даптомицина в присутствии линезолида не изменялось или снижалось в 2 раза в зависимости от штамма стафилококка. Похожая связь между снижением значений МПК антибиотиков под действием друг друга и наблюдаемым антимикробным эффектом этой комбинации в динамической системе была показана при изучении фармакодинамики комбинаций линезолида с рифампицином или гентамицином и даптомицина с рифампицином или гентамицином в отношении *S. aureus* (Firsov et al., 2017; Zinner et al., 2018; Golikova et al., 2019, 2020). Усилению антистафилококкового эффекта указанных комбинаций по сравнению с моделируемыми режимами монотерапии соответствовало снижение значений МПК антибиотиков в присутствии друг друга.

Отмеченное в настоящем исследовании отсутствие возрастания антимикробного эффекта комбинации линезолид-даптомицин по сравнению с моделируемой монотерапией более эффективным даптомицином согласуется с результатами нескольких работ, посвященных изучению эффекта данной комбинации в динамических системах *in vitro* (Luther, LaPlante, 2015; Jørgensen et al., 2016).

Несмотря на сравнимый эффект комбинации линезолид-даптомицин с таковой даптомицина, данная комбинация может представлять интерес с точки зрения ее потенциального «антимутантного» эффекта. Возможность

предотвратить или, по крайней мере, отсрочить развитие резистентности бактерий при проведении антимикробной терапии двумя препаратами повышает шанс успешного лечения. К таким же выводам пришли авторы работы, в которой благодаря «антимутантной» эффективности комбинации линезолид-даптомицин удалось добиться успешного излечения пациентов с энтерококковым менингитом (Le et al., 2010). Настоящее исследование подтверждает перспективность использования линезолида в сочетании с даптомицином для борьбы с резистентностью *S. aureus*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа стала продолжением серии исследований, проводимых ранее в динамических системах *in vitro* с антибиотиками разных групп. По результатам настоящего исследования была подтверждена применимость гипотезы ОСМ к линезолиду при его действии на штаммы *Staphylococcus aureus*. Между резистентностью *S. aureus* к линезолиду и фармакокинетико-фармакодинамическими параметрами, отражающими его концентрацию, были установлены зависимости, описываемые функцией Гаусса или сигмоидной функцией.

До сих пор установить применимость гипотезы ОСМ и получить аналогичные зависимости удалось применительно к антибиотикам групп фторхинолонов, липо- и гликопептидов, цефалоспоринов. Результаты настоящего исследования позволяют предполагать, что развитие резистентности бактерий к антибиотикам разных классов происходит по одним и тем же законам. Установленные зависимости между резистентностью *S. aureus* к линезолиду и фармакокинетико-фармакодинамическими параметрами стали основанием для выбора оптимальных предикторов антибиотикорезистентности.

Согласно полученным результатам, режим дозирования линезолида, применяемый для терапии инфекционных заболеваний, не гарантирует предотвращения развития к нему резистентности *S. aureus*. Мы установили, что сочетанное применение линезолида и даптомицина позволяет предотвратить развитие резистентности *S. aureus* как к линезолиду, так и к даптомицину, и обеспечивает антистафилококковый эффект, сравнимый с эффектом даптомицина в отдельности. На основании полученных результатов можно сделать заключение о перспективности применения данной комбинации антибиотиков в клинике для терапии стафилококковых инфекций с целью снизить риск развития устойчивости данного возбудителя к линезолиду и даптомицину.

ВЫВОДЫ

1. Подтверждена применимость гипотезы существования «окна селекции мутантов» к паре «линезолид – *S. aureus*»: интенсивность селекции устойчивых к линезолиду мутантов золотистого стафилококка зависит от положения фармакокинетического профиля антибиотика относительно «окна селекции мутантов».

2. Установлены зависимости между развитием резистентности *S. aureus* к линезолиду и его концентрацией, выраженной при помощи фармакокинетико-фармакодинамических параметров. Согласно полученным результатам, наиболее надёжными для прогнозирования эффекта линезолида в отношении резистентных мутантов *S. aureus* признаны параметры ПФК/МПК_М и $T_{>МПКМ}$. Рассчитанное на основе этих параметров пороговое значение МПК_М может быть использовано для оценки риска развития резистентности золотистого стафилококка к линезолиду.

3. Показано, что линезолид при его применении в дозе, соответствующей терапевтической, не гарантирует полного подавления селекции устойчивых мутантов *S. aureus*, что позволяет сделать вывод о целесообразности применения линезолида в комбинации с другими антибиотиками.

4. Показано, что сочетанное применение линезолида и даптомицина при моделировании режимов их дозирования, соответствующих клиническим, характеризуется «антимутантным» эффектом в отношении золотистого стафилококка. Отмечен сходный антистафилококковый эффект комбинации линезолида и даптомицина и более эффективного антибиотика из сочетаемых – даптомицина.

5. Показана применимость параметров $T_{>МПКМ}$ и ПОМПК_М для прогнозирования вероятности развития резистентности *S. aureus* к линезолиду и даптомицину при их использовании в комбинации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

«Антимутантный» эффект антибиотика – эффект антибиотика на резистентные субпопуляции бактерии

КОЕ – колониеобразующие единицы

МПК – минимальная подавляющая концентрация антибиотика в отношении всей популяции клеток бактерии, мкг/мл

МПК₅₀ – минимальная подавляющая концентрация антибиотика для 50% штаммов бактерии одного вида, мкг/мл

МПК₉₀ – минимальная подавляющая концентрация антибиотика для 90% штаммов бактерии одного вида, мкг/мл

МПК_{ИСХ} – исходное значение минимальной подавляющей концентрации антибиотика, определённое в начале эксперимента, мкг/мл

МПК_М – минимальная концентрация антибиотика, подавляющая рост устойчивых к нему клеток бактерии (устойчивых мутантов), мкг/мл

МПК_{ФИН} – значение минимальной подавляющей концентрации антибиотика, определённое в конце эксперимента, мкг/мл

ОСМ – «окно селекции мутантов», диапазон концентраций антибиотика, ассоциированный с наибольшей вероятностью обогащения микробной популяции устойчивыми клетками, нижний и верхний пределы которого, соответственно, – МПК и МПК_М данного препарата в отношении микроорганизма-мишени

ПМК – площадь между кинетической кривой изменения численности бактериальных клеток без антибиотика (контрольная кривая) и кинетической кривой изменения численности клеток бактерии в присутствии антибиотика, ограниченная временем (τ), $(\lg \text{КОЕ}/\text{мл}) \times \text{ч}$

ПОМПК_М – площадь, ограниченная фармакокинетическим профилем антибиотика и его МПК_М, $(\lg \text{КОЕ}/\text{мл}) \times \text{ч}$

ППК – площадь под кинетической кривой изменения численности бактериальных клеток, ограниченная временем (τ), и пределом их количественного определения, $(\lg \text{КОЕ/мл}) \times \text{ч}$

ППК_М – площадь под кинетической кривой изменения численности устойчивых к антибиотику клеток бактерии (устойчивых мутантов), ограниченная временем (τ), и пределом их количественного определения, $(\lg \text{КОЕ/мл}) \times \text{ч}$

Предиктор – фармакокинетико-фармакодинамический параметр, используемый для прогнозирования селекции устойчивых к антибиотику клеток бактерии

ПФК – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация антибиотика – время», определяемая в пределах 24 ч, $\text{мкг} \times \text{ч/мл}$

ПФК/МПК – отношение ПФК к МПК, ч

ПФК/МПК_М – отношение ПФК к МПК_М, ч

$C_{\text{МАКС}}$ – максимальная концентрация антибиотика, мкг/мл

$C_{\text{МАКС}}/\text{МПК}$ – отношение $C_{\text{МАКС}}$ антибиотика к МПК

Cl – клиренс, объём плазмы крови, который полностью очищается от лекарственного средства за единицу времени, мл/ч

F – объёмная скорость потока жидкости в динамической системе, мл/ч

I_E – параметр ПМК, определяемый до того момента, когда численность клеток бактерии в фазе вторичного роста равна таковой на контрольной кривой, $(\lg \text{КОЕ/мл}) \times \text{ч}$

k_{el} – константа элиминации препарата, отношение объёмной скорости потока (F) в динамической системе к объёму жидкости (V), ч^{-1}

$N_{\text{ИСХ}}$ – исходная численность клеток бактерии или устойчивых к антибиотику мутантов, $\lg \text{КОЕ/мл}$

$N_{\text{МАКС}}$ – максимальная численность клеток бактерии или устойчивых к антибиотику мутантов, $\lg \text{КОЕ/мл}$

N_t – численность клеток бактерии или устойчивых к антибиотику мутантов в момент времени t , $\lg \text{КОЕ/мл}$

$T_{1/2}$ – период полувыведения, время, за которое концентрация антибиотика в плазме крови снижается в 2 раза, ч

$T_{\text{ОСМ}}$ – время в процентах от интервала дозирования, в течение которого концентрация антибиотика находится в пределах «окна селекции мутантов»

$T_{>\text{МПК}_\text{М}}$ – время в процентах от интервала дозирования, в течение которого концентрация антибиотика превышает $\text{МПК}_\text{М}$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голикова М. В. и др. Прогнозирование развития антибиотикорезистентности бактерий методами фармакокинетико-фармакодинамического моделирования: альтернативные подходы к анализу экспериментальных данных // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. – Т. 60. – №. 9-10. – С. 12-16.
2. Козлов Р. С. и др. Динамика резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибиотикам в России за период 1999-2009 гг. (Результаты многоцентрового проспективного исследования ПеГАС) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2010. – Т. 12. – № 4. – С. 329-341.
3. Палагин И. С. и др. Современное состояние антибиотикорезистентности возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты исследования "ДАРМИС" (2010–2011) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14. – № 4. – С. 280-302.
4. Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи: Российские клинические рекомендации / Под ред. С. В. Яковлева, Н. И. Брико, С. В. Сидоренко, Д. Н. Проценко. – М.: Издательство «Перо». – 2018. – 156 с.
5. Соловьев В. Н., Фирсов А. А., Филов В. А. Фармакокинетика: Руководство. – М.: Медицина. – 1980. – 423 с.
6. Струкова Е. Н. Прогноз антибиотикорезистентности стафилококков в динамических системах *in vitro*, моделирующих фармакокинетику ципрофлоксацина и линезолида. – 2010. – 117 с.
7. Сухорукова М. В. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriales* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015-2016» // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21. – №. 2. – С. 147-159.
8. Фирсов А. А., Назаров А. Д., Черных В. М. Фармакокинетические подходы к оптимизации антибиотикотерапии // Итоги науки и техники. – М.: ВИНТИ. – 1989. – Т. 17. – №. 1. – 228 с.
9. Фирсов А. А., Черных В. М., Кузнецова С. М., Навашин С. М. Динамическая система для изучения кинетики антимикробного эффекта *in vitro* при фармакокинетически обусловленных изменениях концентрации антибиотика. // Антибиотики и Медицинская Биотехнология. – 1985. – XXX (1). – С. 36-43.
10. Шек Е. А. и др. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. В стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического

- исследования «МАРАФОН 2015-2016» // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21. – № 2. – С. 171-180.
11. Эйдельштейн М. В. и др. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015-2016» // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21. – № 2. – С. 160-170.
 12. Яковлев С. В. и др. Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи. Методические рекомендации для лечебно-профилактических учреждений Москвы // Consilium Medicum. – 2017. – Т. 19. – №. 7-1. – С. 15-51.
 13. Aeschlimann J. R., Kaatz G. W., Rybak M. J. The effects of NorA inhibition on the activities of levofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin against two genetically related strains of *Staphylococcus aureus* in an *in-vitro* infection model // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1999. – Vol. 44. – № 3. – P. 343-349.
 14. Aktas G., Derbentli S. *In vitro* activity of daptomycin combined with dalbavancin and linezolid, and dalbavancin with linezolid against MRSA strains // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2017. – Vol. 72. – № 2. – P. 441-443.
 15. Alieva K. N. et al. Time inside the mutant selection window as a predictor of staphylococcal resistance to linezolid // The Journal of Antibiotics. – 2018. – Vol. 71. – № 5. – P. 514-521.
 16. Allen G. P., Bierman B. C. *In vitro* analysis of resistance selection by linezolid in vancomycin-susceptible and-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* // International journal of antimicrobial agents. – 2009. – Vol. 34. – № 1. – P. 21-24.
 17. Allen G. P., Kaatz G. W., Rybak M. J. Activities of mutant prevention concentration-targeted moxifloxacin and levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* pharmacodynamic model // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2003. – Vol. 47. – № 8. – P. 2606-2614.
 18. Allen G. P., Kaatz G. W., Rybak M. J. *In vitro* activities of mutant prevention concentration-targeted concentrations of fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus* in a pharmacodynamic model // International journal of antimicrobial agents. – 2004. – Vol. 24. – № 2. – P. 150-160.
 19. Almeida D. et al. *In vivo* validation of the mutant selection window hypothesis with moxifloxacin in a murine model of tuberculosis // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2007. – Vol. 51. – № 12. – P. 4261-4266.
 20. Antonelli A. et al. Linezolid-resistant *cfr*-positive MRSA, Italy // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2016. – Vol. 71. – № 8. – P. 2349-2351.

21. Aslam B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis // *Infection and drug resistance*. – 2018. – Vol. 11. – P. 1645-1658.
22. Auckland C. et al. Linezolid-resistant enterococci: report of the first isolates in the United Kingdom // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2002. – Vol. 50. – № 5. – P. 743-746.
23. Ba B. B. et al. New approach for accurate simulation of human pharmacokinetics in an *in vitro* pharmacodynamic model: application to ciprofloxacin // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2001. – Vol. 47. – № 2. – P. 223-227.
24. Ba B. B. et al. Activity of linezolid in an *in vitro* pharmacokinetic-pharmacodynamic model using different dosages and *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* strains with and without a hypermutator phenotype // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2010. – Vol. 54. – № 4. – P. 1443-1452.
25. Baquero F. Resistance to quinolones in gram-negative microorganisms: mechanisms and prevention // *European urology*. – 1990. – Vol. 17. – P. 3-12.
26. Baquero F., Negri M. C. Challenges: Selective compartments for resistant microorganisms in antibiotic gradients // *Bioessays*. – 1997. – Vol. 19. – № 8. – P. 731-736.
27. Bender J. et al. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from German hospitals and characterization of two *cfr*-carrying plasmids // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2015. – Vol. 70. – № 6. – P. 1630-1638.
28. Benvenuto M. et al. Pharmacokinetics and tolerability of daptomycin at doses up to 12 milligrams per kilogram of body weight once daily in healthy volunteers // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2006. – Vol. 50. – № 10. – P. 3245-3249.
29. Bergan T. *In vitro* models simulating *in vivo* pharmacokinetics and bacterial response to antibiotics // *Prediction and Assessment of Antibiotic Clinical efficacy*. – 1986. – P. 27-53.
30. Birmingham M. C. et al. Linezolid for the treatment of multidrug-resistant, gram-positive infections: experience from a compassionate-use program // *Clinical Infectious Diseases*. – 2003. – Vol. 36. – № 2. – P. 159-168.
31. Blaser J. *In-vitro* model for simultaneous simulation of the serum kinetics of two drugs with different half-lives // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 1985. – Vol. 15. – Suppl. A. – P. 125-130.
32. Blaser J. et al. Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1987. – Vol. 31. – № 7. – P. 1054-1060.
33. Blaser J., Stone B. B., Zinner S. H. Efficacy of intermittent versus continuous administration of netilmicin in a two-compartment *in vitro* model //

- Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1985. – Vol. 27. – № 3. – P. 343-349.
34. Blaser J., Stone B. B., Zinner S. H. Two compartment kinetic model with multiple artificial capillary units // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 1985. – Vol. 15. – Suppl. A. – P. 131-137.
 35. Blaser J., Zinner S. H. *In vitro* models for the study of antibiotic activities // *Progress in Drug Research*. – Birkhäuser Basel, 1987. – P. 349-381.
 36. Boak L. M. et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic factors influencing emergence of resistance to linezolid in an *in vitro* model // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2007. – Vol. 51. – № 4. – P. 1287-1292.
 37. Boaretti M., Canepari P. Identification of daptomycin-binding proteins in the membrane of *Enterococcus hirae* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1995. – Vol. 39. – № 9. – P. 2068-2072.
 38. Bonapace C. R. et al. Determination of antibiotic effect in an *in vitro* pharmacodynamic model: comparison with an established animal model of infection // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2002. – Vol. 46. – № 11. – P. 3574-3579.
 39. Bonilla H. et al. Multicity outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with clonal spread of a *cfpA*-containing strain // *Clinical infectious diseases*. – 2010. – Vol. 51. – № 7. – P. 796-800.
 40. Bonora M. G. et al. Emergence of linezolid resistance in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* multilocus sequence typing C1 epidemic lineage // *Journal of clinical microbiology*. – 2006. – Vol. 44. – № 3. – P. 1153-1155.
 41. Bouza E., Munoz P. Linezolid: pharmacokinetic characteristics and clinical studies // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2001. – Vol. 7. – P. 75-82.
 42. Boyle-Vavra S. et al. Comparative genome sequencing of an isogenic pair of USA800 clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained before and after daptomycin treatment failure // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2011. – Vol. 55. – № 5. – P. 2018-2025.
 43. Burlison B. S. et al. *Enterococcus faecalis* resistant to linezolid: case series and review of the literature // *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. – 2004. – Vol. 24. – № 9. – P. 1225-1231.
 44. Cai Y. et al. Mutant prevention concentration of colistin alone and in combination with levofloxacin or tobramycin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* // *International journal of antimicrobial agents*. – 2012. – Vol. 40. – № 5. – P. 477-478.
 45. Champion J. J., McNamara P. J., Evans M. E. Evolution of ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus* in *in vitro* pharmacokinetic environments // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2004. – Vol. 48. – № 12. – P. 4733-4744.
 46. Champion J. J. et al. Pharmacodynamic modeling of the evolution of levofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49. – № 6. – P. 2189-2199.

47. Carpenter C. F., Chambers H. F. Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens // *Clinical Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 38. – № 7. – P. 994-1000.
48. Casapao A. M. et al. Multicenter study of high-dose daptomycin for treatment of enterococcal infections // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2013. – Vol. 57. – № 9. – P. 4190-4196.
49. Castanheira M. et al. Variations in the occurrence of resistance phenotypes and carbapenemase genes among *Enterobacteriaceae* isolates in 20 years of the SENTRY antimicrobial surveillance program // *Open forum infectious diseases*. – US: Oxford University Press, 2019. – Vol. 6. – Suppl. 1. – P. S23-S33.
50. Cha R., Brown W. J., Rybak M. J. Bactericidal activities of daptomycin, quinupristin-dalfopristin, and linezolid against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2003. – Vol. 47. – № 12. – P. 3960-3963.
51. Cha R., Rybak M. J. Influence of protein binding under controlled conditions on the bactericidal activity of daptomycin in an *in vitro* pharmacodynamic model // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2004. – Vol. 54. – № 1. – P. 259-262.
52. Cidral T. A. et al. Emergence of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci resistant to linezolid with rRNA gene C2190T and G2603T mutations // *Apmis*. – 2015. – Vol. 123. – № 10. – P. 867-871.
53. Clark C. et al. Resistance selection studies comparing the activity of razupenem (PTZ601) to vancomycin and linezolid against eight methicillin-resistant and two methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2009. – Vol. 53. – № 7. – P. 3118-3121.
54. Conte J. E. et al. Intrapulmonary pharmacokinetics of linezolid // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2002. – Vol. 46. – № 5. – P. 1475-1480.
55. Cottagnoud P. et al. Daptomycin is highly efficacious against penicillin-resistant and penicillin-and quinolone-resistant pneumococci in experimental meningitis // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2004. – Vol. 48. – № 10. – P. 3928-3933.
56. Coyle E. A., Kaatz G. W., Rybak M. J. Activities of newer fluoroquinolones against ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2001. – Vol. 45. – № 6. – P. 1654-1659.
57. Croisier D. et al. *In vivo* pharmacodynamic efficacy of gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an experimental model of pneumonia: impact of the low levels of fluoroquinolone resistance on the enrichment of resistant mutants // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2004. – Vol. 54. – № 3. – P. 640-647.

58. Cubicin (daptomycin for injection). URL: <https://www.cubicin.com/> (дата обращения 01.04.2020).
59. Cui J. et al. The mutant selection window in rabbits infected with *Staphylococcus aureus* // The Journal of infectious diseases. – 2006. – Vol. 194. – № 11. – P. 1601-1608.
60. de Almeida L. M. et al. Linezolid resistance in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates in a Brazilian hospital // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2014. – Vol. 58. – № 5. – P. 2993-2994.
61. Dibo I. et al. Linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from a cord blood transplant recipient // Journal of clinical microbiology. – 2004. – Vol. 42. – № 4. – P. 1843-1845.
62. Diekema D. J. et al. Twenty-year trends in antimicrobial susceptibilities among *Staphylococcus aureus* from the SENTRY antimicrobial surveillance program // Open forum infectious diseases. – US: Oxford University Press, 2019. – Vol. 6. – Suppl. 1. – P. S47-S53.
63. Diekema D. J., Jones R. N. Oxazolidinone antibiotics // The Lancet. – 2001. – Vol. 358. – № 9297. – P. 1975-1982.
64. Drago L. et al. *In vitro* selection of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. by levofloxacin and ciprofloxacin alone and in combination with β -lactams and amikacin // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2005. – Vol. 56. – № 2. – P. 353-359.
65. Drago L., Nicola L., De Vecchi E. A comparative *in-vitro* evaluation of resistance selection after exposure to teicoplanin, vancomycin, linezolid and quinupristin–dalfopristin in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp // Clinical microbiology and infection. – 2008. – Vol. 14. – № 6. – P. 608-611.
66. Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – Vol. 52. – № 1. – P. 11-17.
67. Drugeon H. B., Juvin M. E., Bryskier A. Relative potential for selection of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains by levofloxacin: comparison with ciprofloxacin, sparfloxacin and ofloxacin // Journal of antimicrobial Chemotherapy. – 1999. – Vol. 43. – Suppl. 3. – P. 55-59.
68. Dvorchik B. H. et al. Daptomycin pharmacokinetics and safety following administration of escalating doses once daily to healthy subjects // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2003. – Vol. 47. – № 4. – P. 1318-1323.
69. Egli A. et al. Association of daptomycin use with resistance development in *Enterococcus faecium* bacteraemia – a 7-year individual and population-based analysis // Clinical Microbiology and Infection. – 2017. – Vol. 23. – № 2. – P. 118.e1-118.e7.
70. Entenza J. M. et al. Assessment of the *in vitro* synergy of daptomycin plus linezolid against multidrug-resistant enterococci // Journal of global antimicrobial resistance. – 2014. – Vol. 2. – № 4. – P. 306-308.

71. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU/EEA, annual epidemiological report for 2018. – Stockholm: ECDC; 2019.
72. Evans M. E., Titlow W. B. Levofloxacin selects fluoroquinolone-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* less frequently than ciprofloxacin // The Journal of antimicrobial chemotherapy. – 1998. – Vol. 41. – № 2. – P. 285-288.
73. Fair R. J., Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century // Perspectives in medicinal chemistry. – 2014. – Vol. 6. – P. 25-64.
74. Firsov A. A. et al. A new approach to *in vitro* comparisons of antibiotics in dynamic models: equivalent area under the curve/MIC breakpoints and equiefficient doses of trovafloxacin and ciprofloxacin against bacteria of similar susceptibilities // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1998. – Vol. 42. – № 11. – P. 2841-2847.
75. Firsov A. A. et al. ABT492 and levofloxacin: comparison of their pharmacodynamics and their abilities to prevent the selection of resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* dynamic model // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2004. – T. 54. – № 1. – C. 178-186.
76. Firsov A. A. et al. AUC/MIC relationships to different endpoints of the antimicrobial effect: multiple-dose *in vitro* simulations with moxifloxacin and levofloxacin // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2002. – Vol. 50. – № 4. – P. 533-539. (a)
77. Firsov A. A. et al. Bacterial antibiotic resistance studies using *in vitro* dynamic models: population analysis vs. susceptibility testing as endpoints of mutant enrichment // International journal of antimicrobial agents. – 2015. – Vol. 46. – № 3. – P. 313-318. (a)
78. Firsov A. A. et al. Bacterial resistance studies using *in vitro* dynamic models: the predictive power of the mutant prevention and minimum inhibitory antibiotic concentrations // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2013. – Vol. 57. – № 10. – P. 4956-4962.
79. Firsov A. A. et al. Comparative pharmacodynamics of moxifloxacin and levofloxacin in an *in vitro* dynamic model: prediction of the equivalent AUC/MIC breakpoints and equiefficient doses // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2000. – Vol. 46. – № 5. – P. 725-732. (a)
80. Firsov A. A. et al. Enrichment of fluoroquinolone-resistant *Staphylococcus aureus*: oscillating ciprofloxacin concentrations simulated at the upper and lower portions of the mutant selection window // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2008. – Vol. 52. – № 6. – P. 1924-1928. (a)
81. Firsov A. A. et al. Enrichment of resistant *Staphylococcus aureus* at ciprofloxacin concentrations simulated within the mutant selection window: bolus versus continuous infusion // International journal of antimicrobial agents. – 2008. – Vol. 32. – № 6. – P. 488-493. (b)
82. Firsov A. A. et al. Gemifloxacin and ciprofloxacin pharmacodynamics in an *in-vitro* dynamic model: prediction of the equivalent AUC/MIC breakpoints

- and doses // International journal of antimicrobial agents. – 2000. – Vol. 16. – № 4. – P. 407-414. (b)
83. Firsov A. A. et al. *In vitro* pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2003. – Vol. 47. – № 5. – P. 1604-1613.
84. Firsov A. A. et al. *In vitro* resistance studies with bacteria that exhibit low mutation frequencies: prediction of “antimutant” linezolid concentrations using a mixed inoculum containing both susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2015. – Vol. 59. – № 2. – P. 1014-1019. (b)
85. Firsov A. A. et al. Parameters of bacterial killing and regrowth kinetics and antimicrobial effect examined in terms of area under the concentration-time curve relationships: action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* in an *in vitro* dynamic model // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1997. – Vol. 41. – № 6. – P. 1281-1287.
86. Firsov A. A. et al. Pharmacokinetically-based prediction of the effects of antibiotic combinations on resistant *Staphylococcus aureus* mutants: *in vitro* model studies with linezolid and rifampicin // Journal of Chemotherapy. – 2017. – Vol. 29. – № 4. – P. 220-226.
87. Firsov A. A. et al. Predicting bacterial resistance using the time inside the mutant selection window: possibilities and limitations // International journal of antimicrobial agents. – 2014. – Vol. 44. – № 4. – P. 301-305.
88. Firsov A. A. et al. Prediction of the antimicrobial effects of trovafloxacin and ciprofloxacin on staphylococci using an *in-vitro* dynamic model // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1999. – Vol. 43. – № 4. – P. 483-490.
89. Firsov A. A. et al. Relationships of the area under the curve/MIC ratio to different integral endpoints of the antimicrobial effect: gemifloxacin pharmacodynamics in an *in vitro* dynamic model // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2001. – Vol. 45. – № 3. – P. 927-931.
90. Firsov A. A. et al. Simulated *in vitro* quinolone pharmacodynamics at clinically achievable AUC/MIC ratios: advantage of I_E over other integral parameters // Chemotherapy. – 2002. – Vol. 48. – № 6. – P. 275-279. (b)
91. Firsov A. A. et al. Antistaphylococcal effect related to the area under the curve/MIC ratio in an *in vitro* dynamic model: predicted breakpoints versus clinically achievable values for seven fluoroquinolones // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2005. – Vol. 49. – № 7. – P. 2642-2647.
92. Firsov A. A. et al. Testing the mutant selection window hypothesis with *Staphylococcus aureus* exposed to daptomycin and vancomycin in an *in vitro* dynamic model // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2006. – Vol. 58. – № 6. – P. 1185-1192.
93. Firsov A. A., Portnoy Y. A., Zinner S. H. PK/PD-based prediction of “antimutant” antibiotic exposures using *in vitro* dynamic models // Antimicrobial Resistance in the 21st Century. – Springer, Cham, 2018. – P. 643-666.

94. Firsov A. A., Vostrov S. N., Lubenko I. H., Zinner S.H. Comparative pharmacodynamics of moxifloxacin and grepafloxacin with *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* dynamic model // *Antiinfective Drugs and Chemotherapy*. – 2000. – Vol. 17. – P. 77. (c)
95. Firsov A. A., Zinner S. H., Lubenko I. Y. *In vitro* dynamic models as tools to predict antibiotic pharmacodynamics. // *Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice*. 2nd ed. Section II, Non-clinical models of infection. – USA: Informa Healthcare. – 2007. – P. 45-78.
96. Forrest A. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral grepafloxacin in patients with acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 1997. – Vol. 40. – Suppl. 1. – P. 45-57.
97. Gales A. C. et al. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* during treatment of pulmonary infection in a patient with cystic fibrosis // *International journal of antimicrobial agents*. – 2006. – Vol. 27. – № 4. – P. 300-302.
98. Gawryszewska I. et al. Linezolid-resistant enterococci in Polish hospitals: species, clonality and determinants of linezolid resistance // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2017. – Vol. 36. – № 7. – P. 1279-1286.
99. Gebru E. et al. Mutant-prevention concentration and mechanism of resistance in clinical isolates and enrofloxacin/marbofloxacin-selected mutants of *Escherichia coli* of canine origin // *Journal of medical microbiology*. – 2011. – Vol. 60. – № 10. – P. 1512-1522.
100. Gerber P. et al. Daptomycin is more efficacious than vancomycin against a methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in experimental meningitis // *Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2006. – Vol. 57. – № 4. – P. 720-723.
101. Goessens W. H. F. et al. Role of ceftazidime dose regimen on the selection of resistant *Enterobacter cloacae* in the intestinal flora of rats treated for an experimental pulmonary infection // *Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2007. – Vol. 59. – № 3. – P. 507-516.
102. Golikova M. V. et al. A novel parameter to predict the effects of antibiotic combinations on the development of *Staphylococcus aureus* resistance: *in vitro* model studies at subtherapeutic daptomycin and rifampicin exposures // *Journal of Chemotherapy*. – 2019. – Vol. 31. – № 6. – P. 320-328.
103. Gould I. M., Miró J. M., Rybak M. J. Daptomycin: the role of high-dose and combination therapy for Gram-positive infections // *International journal of antimicrobial agents*. – 2013. – Vol. 42. – № 3. – P. 202-210.
104. Graham D.R. et al. Nosocomial pneumonia study group. A double blind, randomized, multicenter study of nosocomial pneumonia (NOS) comparing trovafloxacin with ciprofloxacin ± clindamycin/metronidazole // *37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1997.

105. Grasso S. Historical review of *in-vitro* models // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1985. – Vol. 15. – Suppl. A. – P. 99-102.
106. Gu B. et al. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus* // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2013. – Vol. 68. – № 1. – P. 4-11.
107. Hanberger H. et al. Pharmacodynamics of daptomycin and vancomycin on *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* demonstrated by studies of initial killing and postantibiotic effect and influence of Ca²⁺ and albumin on these drugs // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1991. – Vol. 35. – № 9. – P. 1710-1716.
108. Halle E. et al. Linezolid-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from a septic patient: report of first isolates in Germany // Infection. – 2004. – Vol. 32. – № 3. – P. 182-183.
109. Hentschke M. et al. Emergence of linezolid resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strain // Infection. – 2008. – Vol. 36. – № 1. – P. 85-87.
110. Hidron A. I. et al. Daptomycin resistance in *Enterococcus faecalis* prosthetic valve endocarditis // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2008. – Vol. 61. – № 6. – P. 1394-1396.
111. Hill R. L. R. et al. Linezolid-resistant ST36 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with prolonged linezolid treatment in two paediatric cystic fibrosis patients // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2010. – Vol. 65. – № 3. – P. 442-445.
112. Hirschwerk D. et al. Diminished susceptibility to daptomycin accompanied by clinical failure in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia // Infection Control & Hospital Epidemiology. – 2006. – Vol. 27. – № 3. – P. 315-317.
113. Hobbs J. K. et al. Consequences of daptomycin-mediated membrane damage in *Staphylococcus aureus* // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2008. – Vol. 62. – № 5. – P. 1003-1008.
114. Homma T. et al. Pharmacodynamic assessment based on mutant prevention concentrations of fluoroquinolones to prevent the emergence of resistant mutants of *Streptococcus pneumoniae* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2007. – Vol. 51. – № 11. – P. 3810-3815.
115. Hsu L. Y. et al. Six cases of daptomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Singapore // Journal of medical microbiology. – 2010. – Vol. 59. – № 12. – P. 1509-1513.
116. Ikeda-Dantsuji Y. et al. Emergence of linezolid-resistant mutants in a susceptible-cell population of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2011. – Vol. 55. – № 5. – P. 2466-2468.
117. Ishiwada N. et al. Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with long-term, repeated linezolid use in a pediatric patient // Journal of Infection and Chemotherapy. – 2016. – Vol. 22. – № 3. – P. 187-190.

118. Johnson A. et al. Emerging linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from two Austrian patients in the same intensive care unit // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 2002. – Vol. 21. – № 10. – P. 751-754.
119. Jongsma K., Joson J., Heidari A. Ceftaroline in the treatment of concomitant methicillin-resistant and daptomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus* infective endocarditis and osteomyelitis: case report // *Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2013. – Vol. 68. – P. 1444-1445.
120. Jørgensen N. P. et al. Rifampicin-containing combinations are superior to combinations of vancomycin, linezolid and daptomycin against *Staphylococcus aureus* biofilm infection *in vivo* and *in vitro* // *FEMS Pathogens and Disease*. – 2016. – Vol. 74. – № 4. – C. ftw019.
121. Julian K. et al. Characterization of a daptomycin-nonsusceptible vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain in a patient with endocarditis // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2007. – Vol. 51. – № 9. – P. 3445-3448.
122. Kanafani Z. A., Federspiel J. J., Fowler Jr V. G. Infective endocarditis caused by daptomycin-resistant *Enterococcus faecalis*: a case report // *Scandinavian journal of infectious diseases*. – 2007. – Vol. 39. – № 1. – P. 75-77.
123. Keil S., Wiedemann B. Mathematical corrections for bacterial loss in pharmacodynamic *in vitro* dilution models // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1995. – Vol. 39. – № 5. – P. 1054-1058.
124. Kelesidis T. et al. Combination therapy with daptomycin, linezolid, and rifampin as treatment option for MRSA meningitis and bacteremia // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 2011. – Vol. 71. – № 3. – P. 286-290.
125. Kelesidis T., Tewhey R., Humphries R. M. Evolution of high-level daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy is associated with limited mutations in the bacterial genome // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2013. – Vol. 68. – № 8. – P. 1926-1928.
126. Klepser M. E. et al. Comparative bactericidal activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in a dynamic *in vitro* model // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2001. – Vol. 45. – № 3. – P. 673-678.
127. Knoll B. M., Hellmann M., Kotton C. N. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* meningitis in adults: case series and review of the literature // *Scandinavian journal of infectious diseases*. – 2013. – Vol. 45. – № 2. – P. 131-139.
128. Kosecka-Strojek M. et al. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in the tertiary children's hospital in Cracow, Poland // *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. – 2020.

129. Kullar R. et al. High-dose daptomycin for treatment of complicated gram-positive infections: a large, multicenter, retrospective study // *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. – 2011. – Vol. 31. – № 6. – P. 527-536.
130. Lacy M. K. et al. Pharmacodynamic comparisons of levofloxacin, ciprofloxacin, and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* model of infection // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1999. – Vol. 43. – № 3. – P. 672-677.
131. Lamp K. C., Rybak M. J. Teicoplanin and daptomycin bactericidal activities in the presence of albumin or serum under controlled conditions of pH and ionized calcium // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1993. – Vol. 37. – № 3. – P. 605-609.
132. LaPlante K. L., Rybak M. J. Impact of high-inoculum *Staphylococcus aureus* on the activities of nafcillin, vancomycin, linezolid, and daptomycin, alone and in combination with gentamicin, in an *in vitro* pharmacodynamic model // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2004. – Vol. 48. – № 12. – P. 4665-4672.
133. Lazaris A. et al. Novel multiresistance *cfp* plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cfp* and *optrA* in VRE // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2017. – Vol. 72. – № 12. – P. 3252-3257.
134. Le J. et al. Treatment of meningitis caused by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: high-dose and combination daptomycin therapy // *Annals of Pharmacotherapy*. – 2010. – Vol. 44. – № 12. – P. 2001-2006.
135. Lee Y. C. et al. A study on combination of daptomycin with selected antimicrobial agents: in vitro synergistic effect of MIC value of 1 mg/L against MRSA strains // *BMC Pharmacology and Toxicology*. – 2019. – Vol. 20. – № 1.
136. Lenhard J. R. et al. Sequential evolution of vancomycin-intermediate resistance alters virulence in *Staphylococcus aureus*: pharmacokinetic/pharmacodynamic targets for vancomycin exposure // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2016. – Vol. 60. – № 3. – P. 1584-1591.
137. Lewis II J. S. et al. Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49. – № 4. – P. 1664-1665.
138. Li X. et al. Evaluation of meropenem regimens suppressing emergence of resistance in *Acinetobacter baumannii* with human simulated exposure in an *in vitro* intravenous-infusion hollow-fiber infection model // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2014. – Vol. 58. – № 11. – P. 6773-6781.
139. Liakopoulos A. et al. A T2504A mutation in the 23S rRNA gene responsible for high-level resistance to linezolid of *Staphylococcus epidermidis* // *Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2009. – Vol. 64. – № 1. – P. 206-207.

140. Liang B. et al. Mutant prevention concentration-based pharmacokinetic/pharmacodynamic indices as dosing targets for suppressing the enrichment of levofloxacin-resistant subpopulations of *Staphylococcus aureus* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2011. – Vol. 55. – № 5. – P. 2409-2412.
141. Lincopan N. et al. Linezolid resistance in *Staphylococcus epidermidis* associated with a G2603T mutation in the 23S rRNA gene // International journal of antimicrobial agents. – 2009. – Vol. 34. – № 3. – P. 281-282.
142. Lister P. D., Sanders C. C. Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 1999. – Vol. 43. – № 1. – P. 79-86. (a)
143. Lister P. D., Sanders C. C. Pharmacodynamics of trovafloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* pharmacokinetic model // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1999. – Vol. 43. – № 5. – P. 1118-1123. (b)
144. Liu L. et al. Comparative study of the mutant prevention concentrations of vancomycin alone and in combination with levofloxacin, rifampicin and fosfomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* // The Journal of antibiotics. – 2013. – Vol. 66. – № 12. – P. 709-712.
145. Locke J. B., Hilgers M., Shaw K. J. Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in *Staphylococci* of clinical origin // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2009. – Vol. 53. – № 12. – P. 5275-5278. (a)
146. Locke J. B., Hilgers M., Shaw K. J. Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700) // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2009. – Vol. 53. – № 12. – P. 5265-5274. (b)
147. Lubenko I. Y. et al. Telavancin and vancomycin pharmacodynamics with *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* dynamic model // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2008. – Vol. 62. – № 5. – P. 1065-1069.
148. Luther M. K., LaPlante K. L. Observed antagonistic effect of linezolid on daptomycin or vancomycin activity against biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* pharmacodynamic model // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2015. – Vol. 59. – № 12. – P. 7790-7794.
149. MacGowan A. et al. Assessment of different antibacterial effect measures used in *in vitro* models of infection and subsequent use in pharmacodynamic correlations for moxifloxacin // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2000. – Vol. 46. – № 1. – P. 73-78.
150. MacGowan A. P. et al. Activities of moxifloxacin against, and emergence of resistance in, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* pharmacokinetic model // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2003. – Vol. 47. – № 3. – P. 1088-1095.

151. MacGowan A. P. et al. Pharmacodynamics of gemifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* pharmacokinetic model of infection // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2001. – Vol. 45. – № 10. – P. 2916-2921.
152. MacGowan A. P. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of linezolid in healthy volunteers and patients with Gram-positive infections // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – Vol. 51. – Suppl. 2. – P. ii17-ii25.
153. Madaras-Kelly K. J., Demasters T. A. *In vitro* characterization of fluoroquinolone concentration/MIC antimicrobial activity and resistance while simulating clinical pharmacokinetics of levofloxacin, ofloxacin, or ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* // Diagnostic microbiology and infectious disease. – 2000. – Vol. 37. – № 4. – P. 253-260.
154. Madaras-Kelly K. J., Larsson A. J., Rotschafer J. C. A pharmacodynamic evaluation of ciprofloxacin and ofloxacin against two strains of *Pseudomonas aeruginosa* // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1996. – Vol. 37. – № 4. – P. 703-710. (a)
155. Madaras-Kelly K. J. et al. Twenty-four-hour area under the concentration-time curve/MIC ratio as a generic predictor of fluoroquinolone antimicrobial effect by using three strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *in vitro* pharmacodynamic model // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1996. – Vol. 40. – № 3. – P. 627-632. (b)
156. Marchbanks C. R. et al. Dose ranging and fractionation of intravenous ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* model of infection // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1993. – Vol. 37. – № 9. – P. 1756-1763.
157. Matono T. et al. Emergence of a daptomycin-non-susceptible *Enterococcus faecium* strain that encodes mutations in DNA repair genes after high-dose daptomycin therapy // BMC Research Notes. – 2016. – Vol. 9. – № 1. – P. 1-6.
158. Meagher A. K. et al. Population pharmacokinetics of linezolid in patients treated in a compassionate-use program // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2003. – Vol. 47. – № 2. – P. 548-553.
159. Meka V. G. et al. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA // The Journal of infectious diseases. – 2004. – Vol. 190. – № 2. – P. 311-317. (a)
160. Meka V. G. et al. Reversion to susceptibility in a linezolid-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus* // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2004. – Vol. 54. – № 4. – P. 818-820. (b)
161. Mendes R. E. et al. ZAAPS programme results for 2016: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from medical centres in 42 countries // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2018. – Vol. 73. – № 7. – P. 1880-1887.

162. Meyer E. et al. Increasing consumption of MRSA-active drugs without increasing MRSA in German ICUs // *Intensive care medicine*. – 2011. – Vol. 37. – № 10. – P. 1628-1632.
163. Miller K. et al. Linezolid and tiamulin cross-resistance in *Staphylococcus aureus* mediated by point mutations in the peptidyl transferase center // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2008. – Vol. 52. – № 5. – P. 1737-1742.
164. Moellering Jr R. C. A novel antimicrobial agent joins the battle against resistant bacteria // *Annals of internal medicine*. – 1999. – T. 130. – № 2. – C. 155-157.
165. Moellering Jr R. C. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial // *Annals of internal medicine*. – 2003. – Vol. 139. – № 10. – P. 864.
166. Morales G. et al. Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* // *Clinical Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 50. – № 6. – P. 821-825.
167. Munoz-Price L. S., Lolans K., Quinn J. P. Emergence of resistance to daptomycin during treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* infection // *Clinical infectious diseases*. – 2005. – Vol. 41. – № 4. – P. 565-566.
168. Murakawa T. *In vitro/in vivo* kinetic models for evaluating efficacy of antimicrobial agents // *Pharmacokinetics of antimicrobial agents: principles, methods, application, Part IV, Pharmacokinetics and therapeutic efficacy, Section IV-1*. – Landsberg/Lech: Ecomed Verlags. – 1993. – P. 165-177.
169. Navashin S. M. et al. A dynamic model for *in-vitro* evaluation of antimicrobial action by simulation of the pharmacokinetic profiles of antibiotics // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 1989. – Vol. 23. – № 3. – P. 389-399.
170. Niederman M. et al. A double blind, randomized, multicenter, global study in hospitalized community acquired pneumonia (CAP) comparing trovafloxacin with ceftriaxone erythromycin // *37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1997.
171. Odenholt I., Löwdin E., Cars O. Pharmacodynamic effects of telavancin against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in the presence of human albumin or serum and in an *in vitro* kinetic model // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2007. – Vol. 51. – № 9. – P. 3311-3316.
172. O'grady F., Pennington J. H. Bacterial growth in an *in vitro* system simulating conditions in the urinary bladder // *British journal of experimental pathology*. – 1966. – Vol. 47. – № 2. – P. 152.
173. Olofsson S. K. et al. Selection of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* in an *in vitro* kinetic model: relation between drug exposure and mutant prevention concentration // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2006. – Vol. 57. – № 6. – P. 1116-1121.

174. O'Neill A. J., Cove J. H., Chopra I. Mutation frequencies for resistance to fusidic acid and rifampicin in *Staphylococcus aureus* // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2001. – Vol. 47. – № 5. – P. 647-650.
175. Parra-Ruiz J. et al. Activity of linezolid and high-dose daptomycin, alone or in combination, in an *in vitro* model of *Staphylococcus aureus* biofilm // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2012. – Vol. 67. – № 11. – P. 2682-2685.
176. Pfaller M. A. et al. Five-year summary of *in vitro* activity and resistance mechanisms of linezolid against clinically important Gram-positive cocci in the United States from the LEADER Surveillance Program (2011 to 2015) // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2017. – Vol. 61. – № 7.
177. Perry C. M., Balfour J. A. B., Lamb H. M. Gatifloxacin // Drugs. – 1999. – Vol. 58. – № 4. – P. 683-696.
178. Peterson M. L. et al. Fluoroquinolone resistance in *Bacteroides fragilis* following sparfloracin exposure // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1999. – Vol. 43. – № 9. – P. 2251-2255.
179. Peterson M. L. et al. Pharmacodynamics of trovafloxacin and levofloxacin against *Bacteroides fragilis* in an *in vitro* pharmacodynamic model // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2002. – Vol. 46. – № 1. – P. 203-210.
180. Rana B. et al. Linezolid penetration into osteo-articular tissues // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2002. – Vol. 50. – № 5. – P. 747-750.
181. Rayner C. R. et al. Clinical pharmacodynamics of linezolid in seriously ill patients treated in a compassionate use programme // Clinical pharmacokinetics. – 2003. – Vol. 42. – № 15. – P. 1411-1423.
182. Riser M. S. et al. Cerebrospinal fluid penetration of high-dose daptomycin in suspected *Staphylococcus aureus* meningitis // Annals of Pharmacotherapy. – 2010. – Vol. 44. – № 11. – P. 1832-1835.
183. Rose W. E., Leonard S. N., Rybak M. J. Evaluation of daptomycin pharmacodynamics and resistance at various dosage regimens against *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibilities to daptomycin in an *in vitro* pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2008. – Vol. 52. – № 9. – P. 3061-3067.
184. Ross G. H. et al. Fluoroquinolone resistance in anaerobic bacteria following exposure to levofloxacin, trovafloxacin, and sparfloracin in an *in vitro* pharmacodynamic model // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2001. – Vol. 45. – № 7. – P. 2136-2140.
185. Rybak M. J., Allen G. P., Hershberger E. *In vitro* antibiotic pharmacodynamic models // Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice. Marcell Dekker, Inc.: New York. – 2001. – P. 41-65.
186. Rybak M. J. et al. *In vitro* activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against *Staphylococci* and *Enterococci*,

- including vancomycin-intermediate and-resistant strains // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – Vol. 44. – № 4. – P. 1062-1066.
187. Sader H. S. et al. Daptomycin activity tested against 164 457 bacterial isolates from hospitalised patients: summary of 8 years of a Worldwide Surveillance Programme (2005–2012) // *International journal of antimicrobial agents*. – 2014. – Vol. 43. – № 5. – P. 465-469.
188. Sakoulas G. et al. Ampicillin enhances daptomycin-and cationic host defense peptide-mediated killing of ampicillin-and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2012. – Vol. 56. – № 2. – P. 838-844.
189. Schentag J. J., Meagher A. K., Forrest A. Fluoroquinolone AUIC Break Points and the Link to Bacterial Killing Rates: Part 1: *In Vitro* and Animal Models // *Annals of Pharmacotherapy*. – 2003. – Vol. 37. – № 9. – P. 1287-1298.
190. Schmidt S. et al. Effect of protein binding on the pharmacological activity of highly bound antibiotics // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2008. – Vol. 52. – № 11. – P. 3994-4000.
191. Seaton R. A. et al. Evaluation of effectiveness and safety of high-dose daptomycin: results from patients included in the European Cubicin® outcomes registry and experience // *Advances in therapy*. – 2015. – Vol. 32. – № 12. – P. 1192-1205.
192. Seedat J. et al. Rapid emergence of resistance to linezolid during linezolid therapy of an *Enterococcus faecium* infection // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2006. – Vol. 50. – № 12. – P. 4217-4219.
193. Shaw K. J., Barbachyn M. R. The oxazolidinones: past, present, and future // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 1241. – № 1. – P. 48-70.
194. Shortridge D. et al. Geographic and temporal patterns of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* over 20 years from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997–2016 // *Open forum infectious diseases*. – US: Oxford University Press, 2019. – Vol. 6. – Suppl. 1. – P. S63-S68.
195. Silverman J. A. et al. Resistance studies with daptomycin // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2001. – Vol. 45. – № 6. – P. 1799-1802.
196. Silverman J. A., Perlmutter N. G., Shapiro H. M. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2003. – Vol. 47. – № 8. – P. 2538-2544.
197. Smirnova M. et al. Bacterial strain-independent pharmacodynamics of linezolid/doxycycline combinations with *Staphylococcus aureus*: 5-day simulations using an *in vitro* dynamic model P1519 // *Clinical Microbiology & Infection*. – 2006. – Vol. 12.
198. Smith J. R. et al. Combination of tedizolid and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* model of simulated

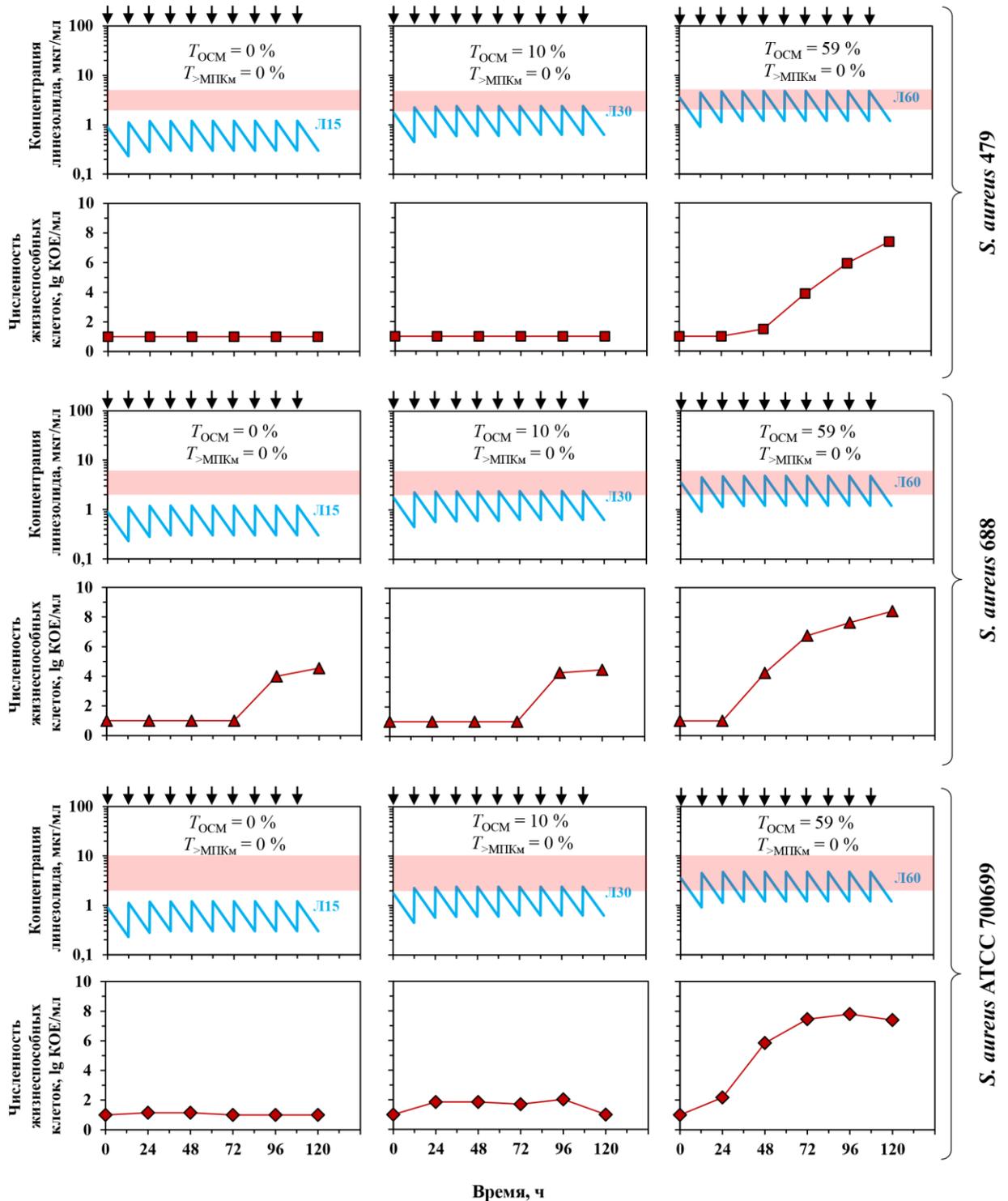
- endocardial vegetations // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2018. – Vol. 62. – № 5.
199. Snyderman D. R. et al. Comparative *in vitro* activities of daptomycin and vancomycin against resistant gram-positive pathogens // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2000. – Vol. 44. – № 12. – P. 3447-3450.
200. Stalker D. J., Jungbluth G. L. Clinical pharmacokinetics of linezolid, a novel oxazolidinone antibacterial // Clinical pharmacokinetics. – 2003. – Vol. 42. – № 13. – P. 1129-1140.
201. Stearne L. E. T. et al. Effect of dosing and dosing frequency on the efficacy of ceftizoxime and the emergence of ceftizoxime resistance during the early development of murine abscesses caused by *Bacteroides fragilis* and *Enterobacter cloacae* mixed infection // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2007. – Vol. 51. – № 10. – P. 3605-3611.
202. Steed M. E., Vidailac C., Rybak M. J. Novel daptomycin combinations against daptomycin-nonsusceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* model of simulated endocardial vegetations // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2010. – Vol. 54. – № 12. – P. 5187-5192.
203. Stefani S. et al. Insights and clinical perspectives of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: a review of the available evidence // International journal of antimicrobial agents. – 2015. – Vol. 46. – № 3. – P. 278-289.
204. Strukova E. N. et al. Linezolid pharmacodynamics with *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* dynamic model // International journal of antimicrobial agents. – 2009. – Vol. 33. – № 3. – P. 251-254.
205. Strukova E. N. et al. Searching for the optimal predictor of ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* by using *in vitro* dynamic models // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2016. – Vol. 60. – № 3. – P. 1208-1215.
206. Strukova E. N. et al. Predictors of bacterial resistance using *in vitro* dynamic models: area under the concentration–time curve related to either the minimum inhibitory or mutant prevention antibiotic concentration // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2016. – Vol. 71. – № 3. – P. 678-684. (a)
207. Strukova E. N. et al. Searching for the optimal predictor of ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* by using *in vitro* dynamic models // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2016. – Vol. 60. – № 3. – P. 1208-1215. (b)
208. Sullivan J., Gezon J., Williams Hopkins D., and the Trovan Community Pneumonia Study Group. Double blind, randomized, multicenter study in ambulatory community acquired pneumonia (CAP) comparing trovafloxacin with clarithromycin // 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1997.
209. Swoboda S. et al. Varying linezolid susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates during therapy: a case report // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2005. – Vol. 56. – № 4. – P. 787-789.

210. Tacconelli E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2018. – Vol. 18. – № 3. – P. 318-327.
211. Tam V. H. et al. The relationship between quinolone exposures and resistance amplification is characterized by an inverted U: a new paradigm for optimizing pharmacodynamics to counterselect resistance // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2007. – Vol. 51. – № 2. – P. 744-747.
212. Taylor S. D., Palmer M. The action mechanism of daptomycin // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2016. – Vol. 24. – № 24. – P. 6253-6268.
213. Thorburn C. E., Edwards D. I. The effect of pharmacokinetics on the bactericidal activity of ciprofloxacin and sparfloxacin against *Streptococcus pneumoniae* and the emergence of resistance // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2001. – Vol. 48. – № 1. – P. 15-22.
214. Tran T. T., Munita J. M., Arias C. A. Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 1354. – P. 1-33.
215. Tsiodras S. et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* // *The Lancet*. – 2001. – Vol. 358. – № 9277. – P. 207-208.
216. Tsuji B. T. et al. Evaluation of daptomycin, telavancin, teicoplanin, and vancomycin activity in the presence of albumin or serum // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 2008. – Vol. 60. – № 4. – P. 441-444.
217. Turnidge J. et al. Daptomycin in the treatment of enterococcal bloodstream infections and endocarditis: a EUCAST position paper // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2020. – Vol. 26. – № 8. – P. 1039-1043.
218. Vena A. et al. Daptomycin plus trimethoprim/sulfamethoxazole combination therapy in post-neurosurgical meningitis caused by linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 2013. – Vol. 76. – № 1. – P. 99-102.
219. Vikram H. R. et al. Clinical progression of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vertebral osteomyelitis associated with reduced susceptibility to daptomycin // *Journal of clinical microbiology*. – 2005. – Vol. 43. – № 10. – P. 5384-5387.
220. Vostrov S. N. et al. Comparative pharmacodynamics of gatifloxacin and ciprofloxacin in an in vitro dynamic model: prediction of equiefficient doses and the breakpoints of the area under the curve/MIC ratio // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2000. – Vol. 44. – № 4. – P. 879-884.
221. Wei W. et al. Activity of levofloxacin in combination with colistin against *Acinetobacter baumannii*: *In vitro* and in a *Galleria mellonella* model // *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. – 2017. – Vol. 50. – № 6. – P. 821-830.
222. White R. L. What *in vitro* models of infection can and cannot do // *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. – 2001. – Vol. 21. – № 11P2. – P. 292S-301S.

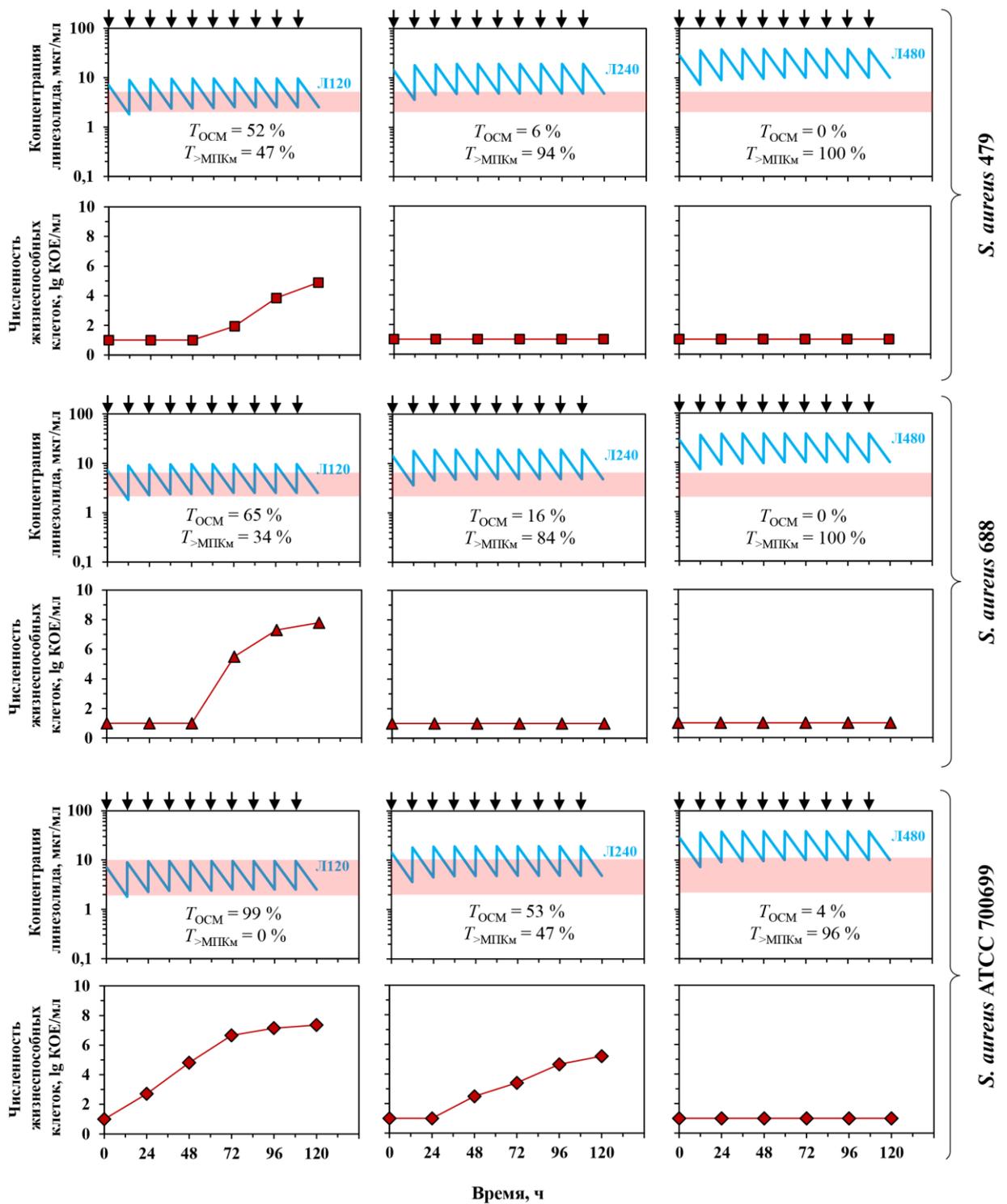
223. WHO. Global action plan on antimicrobial resistance. – 2015.
224. WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. – 2017.
225. Weidemann B. Comparative study of the activity of grepafloxacin and ciprofloxacin in an *in vitro* model with *S. pneumoniae*, *H. Influenzae* and *M. Catarrhalis*. // *Antiinfective Drugs and Chemotherapy*. – 1998, Vol. 16. – Suppl. 71. – P. T142.
226. Wilson P. et al. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2003. – Vol. 51. – № 1. – P. 186-188.
227. Wright D. H. et al. Comparative pharmacodynamics of three newer fluoroquinolones versus six strains of staphylococci in an *in vitro* model under aerobic and anaerobic conditions // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2002. – Vol. 46. – № 5. – P. 1561-1563.
228. Wu G. et al. Daptomycin: evaluation of a high-dose treatment strategy // *International journal of antimicrobial agents*. – 2011. – Vol. 38. – № 3. – P. 192-196.
229. Wu J. et al. Antimicrobial activity of linezolid combined with minocycline against vancomycin-resistant *Enterococci* // *Chinese medical journal*. – 2013. – Vol. 126. – № 14. – P. 2670-2675.
230. Yoshida K. et al. Linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated after long-term, repeated use of linezolid // *Journal of infection and chemotherapy*. – 2009. – Vol. 15. – № 6. – P. 417-419.
231. Yu Z. et al. Recurrent linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* infection in a patient with pneumonia // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2015. – Vol. 30. – P. 49-51.
232. Zhang T. H. et al. Daptomycin forms cation-and size-selective pores in model membranes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2014. – Vol. 1838. – № 10. – P. 2425-2430.
233. Zhao X., Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies // *Clinical Infectious Diseases*. – 2001. – Vol. 33. – Suppl. 3. – P. S147-S156.
234. Zhang X. et al. Gatifloxacin pharmacokinetics in healthy men and women // *The Journal of Clinical Pharmacology*. – 2006. – Vol. 46. – № 10. – P. 1154-1162.
235. Zhanel G. G. et al. *In vitro* pharmacodynamic modelling simulating free serum concentrations of fluoroquinolones against multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* // *Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2001. – Vol. 47. – № 4. – P. 435-440.
236. Zhanel G. G. et al. Mutant prevention concentrations of levofloxacin alone and in combination with azithromycin, ceftazidime, colistin (Polymyxin E), meropenem, piperacillin-tazobactam, and tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2006. – Vol. 50. – № 6. – P. 2228-2230.

237. Zhu Y. et al. Testing the mutant selection window in rabbits infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to vancomycin // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2012. – Vol. 67. – № 11. – P. 2700-2706.
238. Zinner S. H. et al. Emergence of resistant *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* dynamic model that simulates moxifloxacin concentrations inside and outside the mutant selection window: related changes in susceptibility, resistance frequency and bacterial killing // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – Vol. 52. – № 4. – P. 616-622.
239. Zinner S. H. et al. Comparative pharmacodynamics of the new fluoroquinolone ABT492 and ciprofloxacin with *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* dynamic model // International journal of antimicrobial agents. – 2004. – Vol. 24. – № 2. – P. 173-177.
240. Zinner S. H. et al. Concentration–resistance relationships with *Pseudomonas aeruginosa* exposed to doripenem and ciprofloxacin in an *in vitro* model // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2013. – Vol. 68. – № 4. – P. 881-887.
241. Zinner S. H. et al. Predicting antibiotic combination effects on the selection of resistant *Staphylococcus aureus*: *In vitro* model studies with linezolid and gentamicin // International journal of antimicrobial agents. – 2018. – Vol. 52. – № 6. – P. 854-860.
242. Zinner S. H. et al. Selection of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in an *in vitro* dynamic model: protective effect of doxycycline // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2008. – Vol. 61. – № 3. – P. 629-635.
243. ZYVOX (linezolid). Pfizer medical information. URL: <https://www.pfizermedicalinformation.com/en-us/zyvox?section=indications-usage> (дата обращения 01.04.2020).

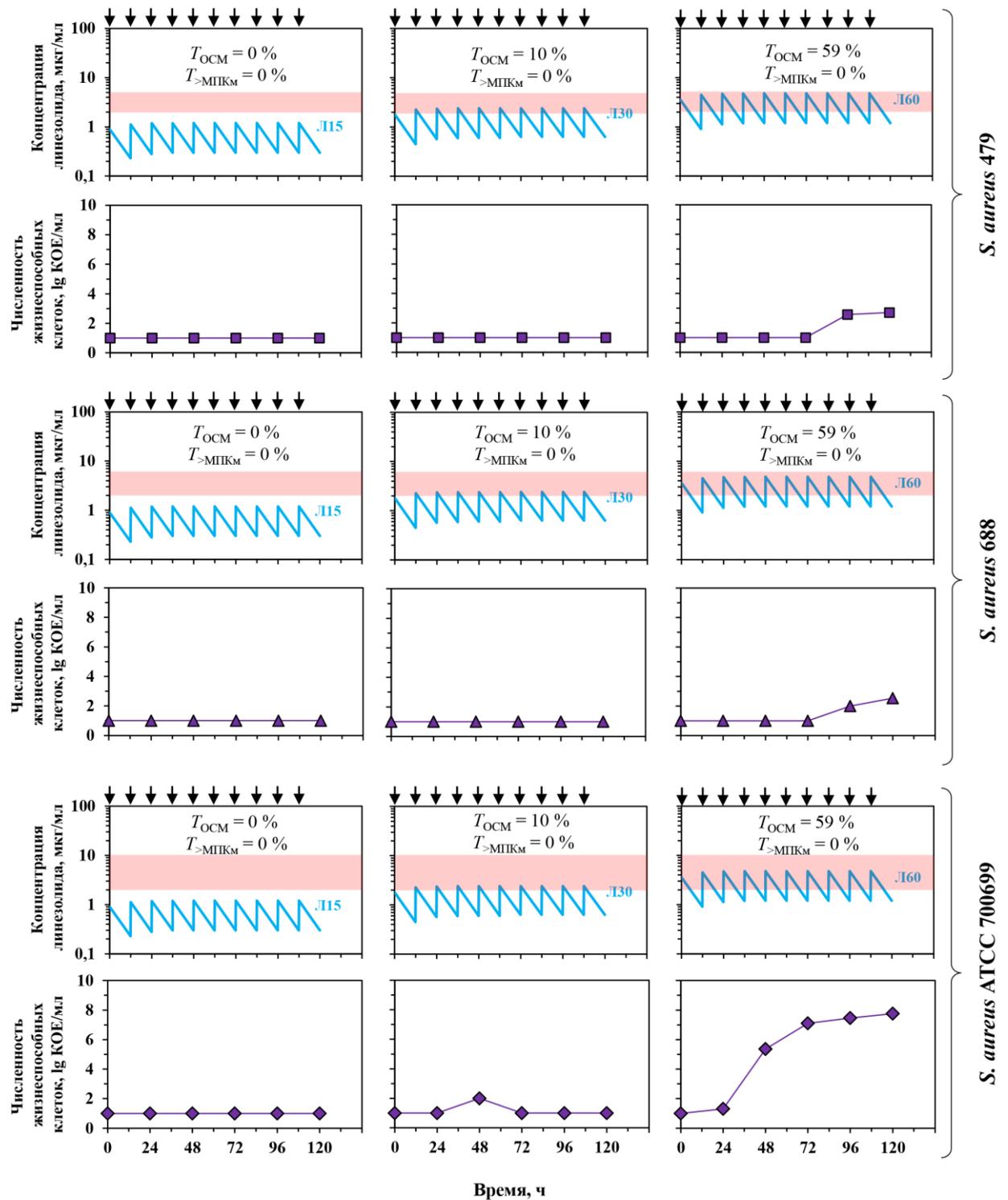
ПРИЛОЖЕНИЯ



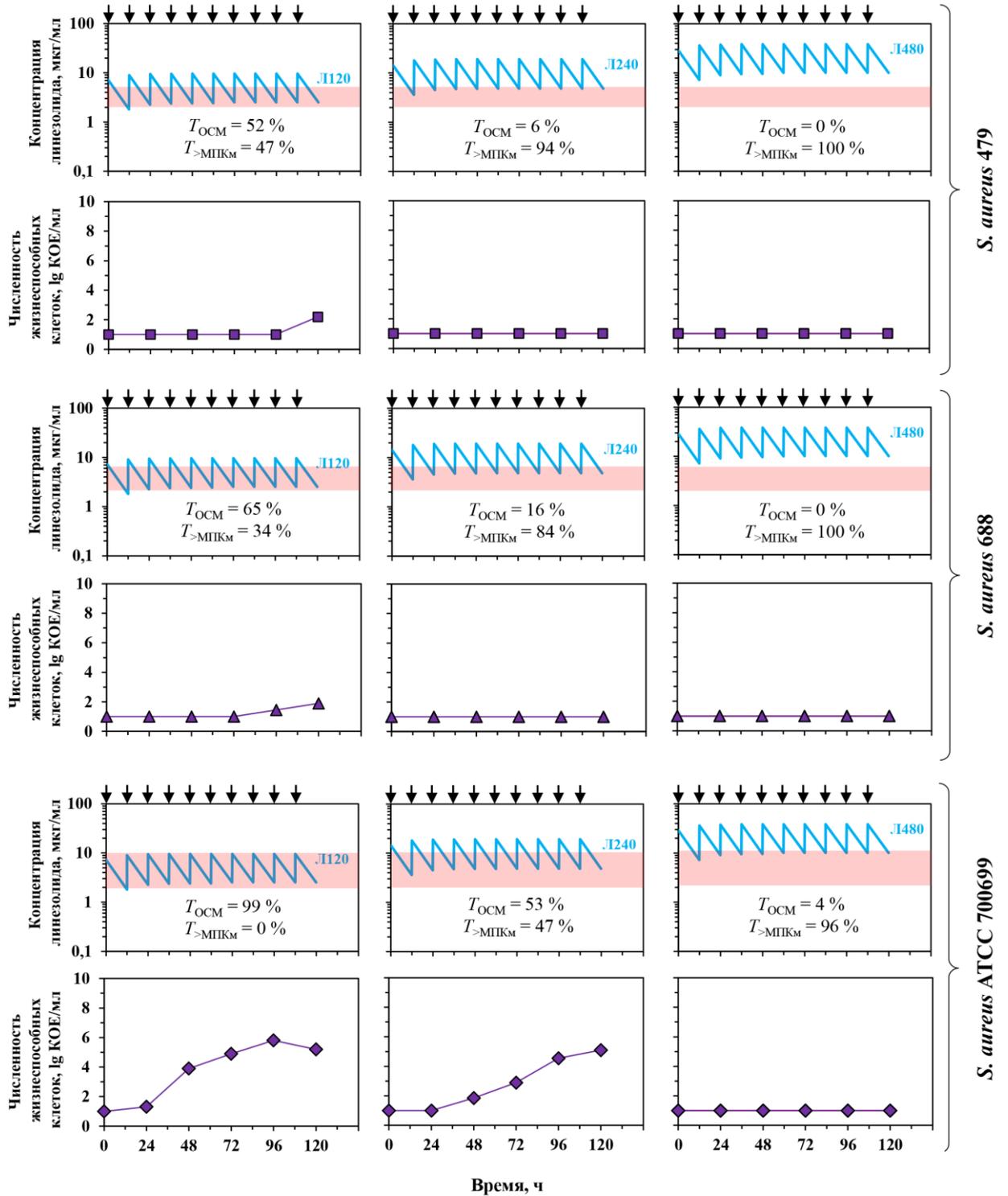
Приложение 1 (А). Моделируемые профили линезолида и кинетические кривые изменения численности мутантов *S. aureus*, устойчивых к $4 \times$ МПК линезолида. Моменты введения линезолида обозначены стрелками. ОСМ обозначены закрашенными областями.



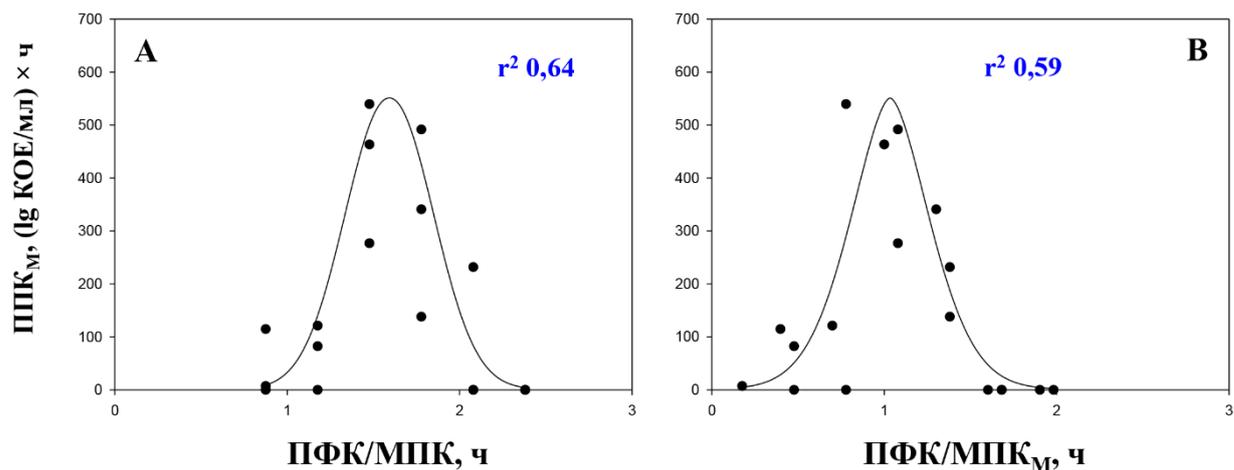
Приложение 1 (Б). Моделируемые профили линезолида и кинетические кривые изменения численности мутантов *S. aureus*, устойчивых к $4 \times \text{МПК}$ линезолида. Моменты введения линезолида обозначены стрелками. ОСМ обозначены закрашенными областями.



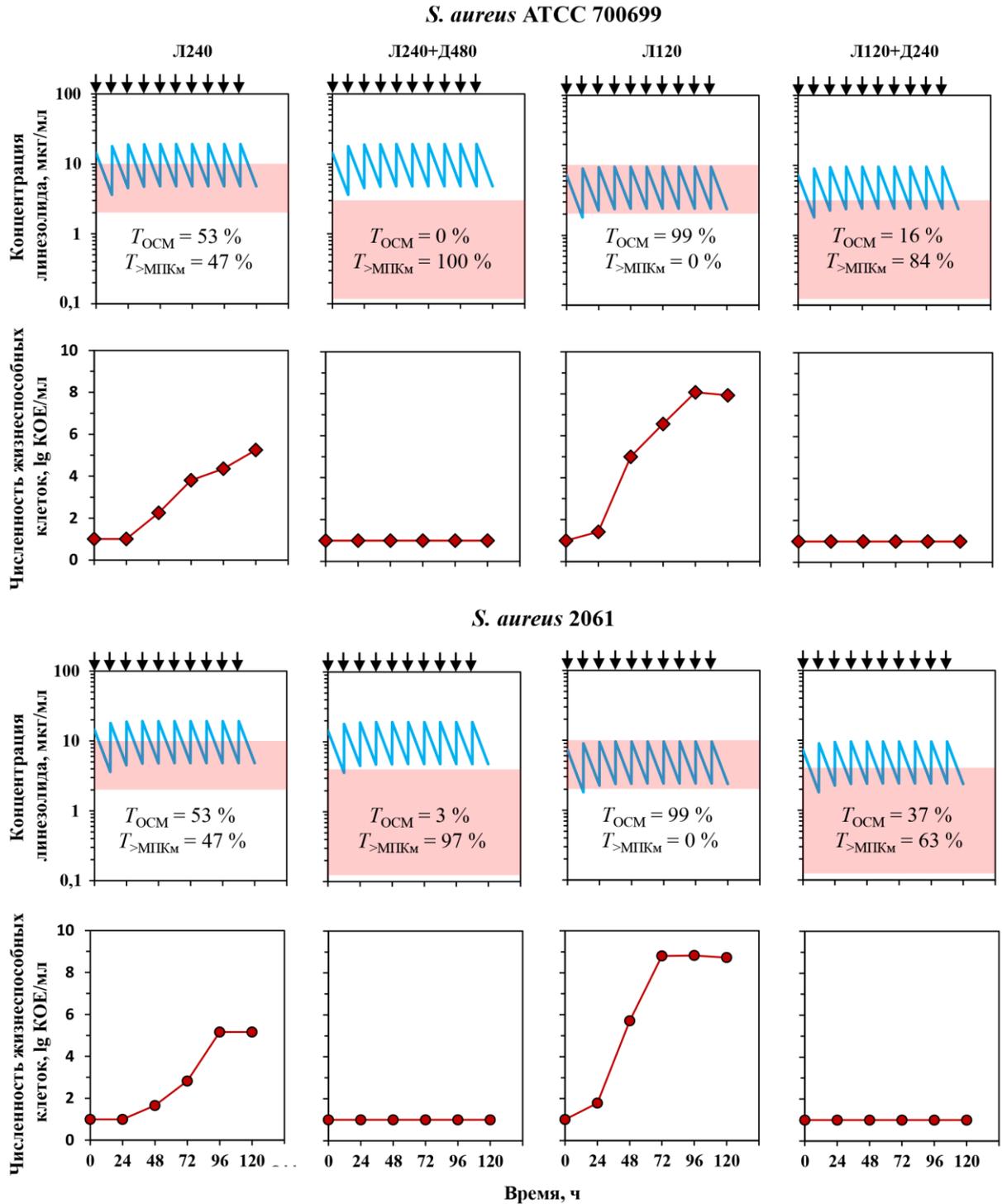
Приложение 2 (А). Моделируемые профили линезолида и кинетические кривые изменения численности мутантов *S. aureus*, устойчивых к $4 \times \text{МПК}$ линезолида. Моменты введения линезолида обозначены стрелками. ОСМ обозначены закрашенными областями.



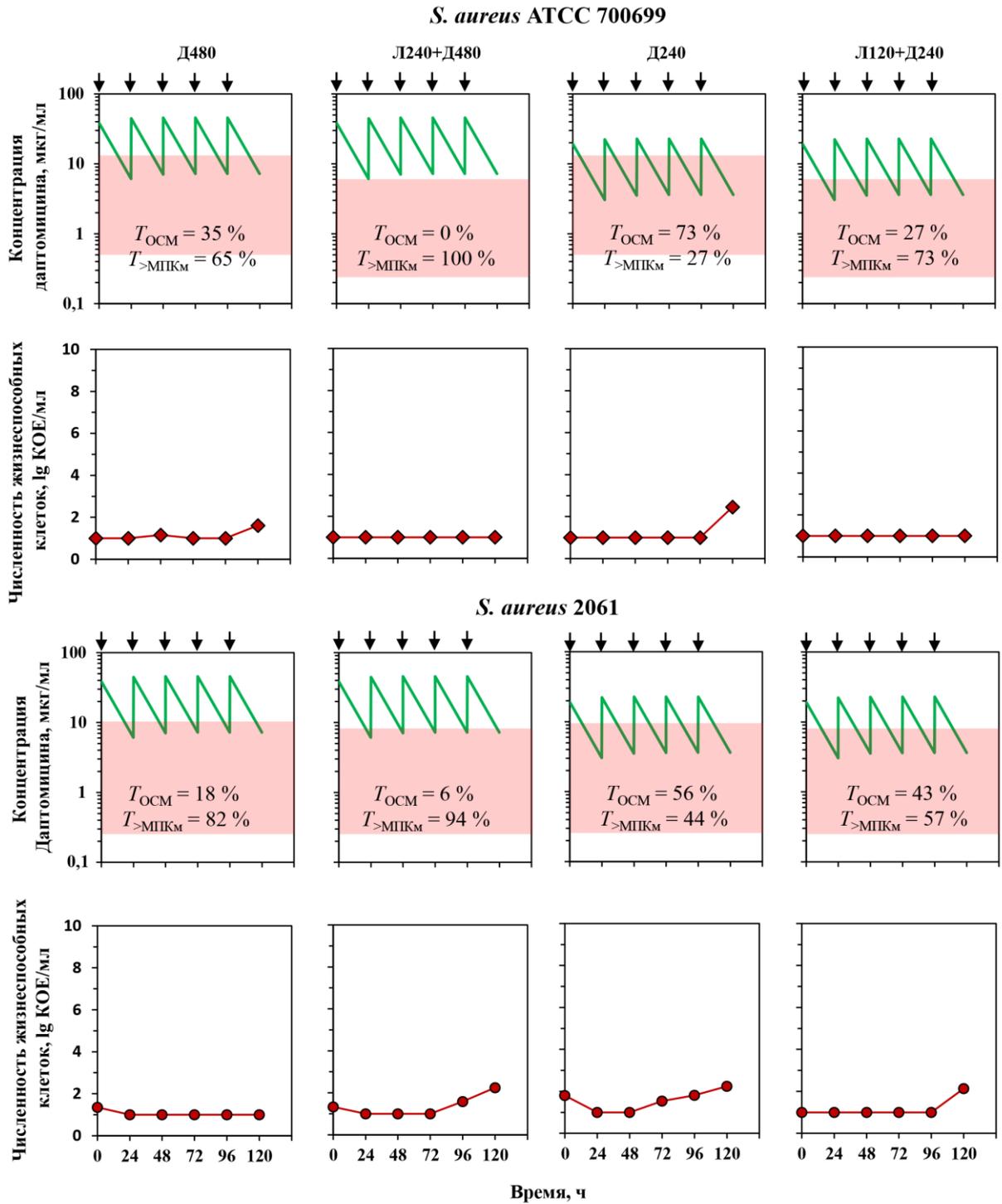
Приложение 2 (Б). Моделируемые профили линезолида и кинетические кривые изменения численности мутантов *S. aureus*, устойчивых к 4xМПК линезолида. Моменты введения линезолида обозначены стрелками. ОСМ обозначены закрашенными областями.



Приложение 3. Зависимости $ППК_M$ для мутантов, устойчивых к $4 \times МПК$ линезолида (объединённые ненормированные данные по трём штаммам *S. aureus*), от $ПФК/МПК$ и от $ПФК/МПК_M$, описываемые Уравнением 18: $Y_0 = 1$, $x_0 = 1,5926$, $a = 550$, $b = 0,2547$, $c = 2,0596$ (А), $Y_0 = 1$, $x_0 = 1,0339$, $a = 550$, $b = 0,2196$, $c = 1,6835$ (Б).



Приложение 5. Моделируемые профили линезолида и кинетические кривые изменения численности мутантов *S. aureus*, устойчивых 4×МПК линезолида при моделируемых терапевтических и субтерапевтических значениях ПФК при отсутствии и в присутствии даптомицина. ОСМ обозначены закрашенными областями.



Приложение 6. Моделируемые профили даптомицина и кинетические кривые изменения численности мутантов *S. aureus*, устойчивых $4 \times \text{МПК}$ даптомицина при моделируемых терапевтических и субтерапевтических значениях ПФК при отсутствии и в присутствии линезолида. ОСМ обозначены закрашенными областями.