

Д. В. ТАПАЛЬСКИЙ, М. В. СИМОНЧИК, Е. В. КАРПОВА

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СЕЛЕКТИВНОЙ ДЕКОНТАМИНАЦИИ КИШЕЧНИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОКАМЕРНОЙ ДИНАМИЧЕСКОЙ ПРОТОЧНОЙ СИСТЕМЫ

Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук
Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

Сконструирована, собрана и откалибрована динамическая проточная система, моделирующая в режиме реального времени пероральное поступление антибиотиков в кишечник и их постепенную элиминацию. Выполнено моделирование энтерального введения колистина и рифампицина. При сопоставлении расчетных моделируемых концентраций рифампицина и его концентраций, фактически создаваемых динамичной проточной системой, получены совпадающие кинетические профили.

Ключевые слова: фармакокинетика, антибиотики, моделирование, деконтаминация кишечника.

Введение. Инфекционные осложнения после трансплантации печени, кардиохирургических вмешательств, операций на органах желудочно-кишечного тракта, а также у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии представляют серьезную угрозу для жизни, так как в значительной степени способствуют увеличению продолжительности госпитализации и являются основной причиной летальных исходов в этот период [1]. С учетом особенностей патогенеза разнообразных критических состояний, при которых происходит транслокация микроорганизмов эндогенной микробиоты, которая часто становится этиологическим фактором микробных осложнений, применяют различные режимы антимикробной терапии и антибиотикопрофилактики. Одним из методов антибиотикотерапии является метод селективной деконтаминации кишечника (СДК). Данный метод представляет собой профилактическую стратегию, состоящую из введения противомикробных препаратов для уменьшения количества факультативно анаэробных грамотрицательных бактерий в кишечнике и предотвращения инфекций, вызываемых этими микроорганизмами при транслокации за пределы желудочно-кишечного тракта [2].

В многочисленных клинических исследованиях было показано, что применение СДК позволяет проводить эффективную профилактику инфекционных осложнений при разнообразных критических состояниях. Данный метод антимикробной профилактики позволяет повышать выживаемость пациентов, сокращать время их пребывания в стационаре, а также имеет высокую экономическую эффективность [3].

Эффективность СДК во многом зависит от поддержания терапевтических концентраций антибиотиков в просвете кишечника, что требует точного понимания их фармакокинетики при энтеральном введении. Традиционные методы изучения фармакокинетики антимикробных препаратов *in vivo* и *in vitro* обладают рядом ограничений, включая высокую стоимость, сложность контроля динамики концентраций и этические барьеры при использовании животных моделей [4]. В связи с этим разработка динамических проточных систем, имитирующих физиологические условия кишечника, представляет значительный интерес для доклинических исследований [5].

Ввиду развития устойчивости бактерий к антибиотикам, важной задачей современной антибиотикотерапии является разработка новых режимов дозирования, обеспечивающих предотвращение селекции устойчивых мутантов в процессе лечения. Для этих целей возможно проведение исследований антимикробного эффекта в динамических системах, с помощью которых можно моделировать фармакокинетические профили антибактериальных

препаратов *in vitro*. Это открывает возможность для определения минимальных концентраций антибиотиков, предотвращающих селекцию антибиотикорезистентных мутантов (МПК_М) и оптимизации режимов дозирования [6].

Способность антибиотика вызывать гибель чувствительной части популяции, которая является основной мишенью в динамической системе, не всегда отражает его способность воздействовать на резистентные микроорганизмы, образующиеся в результате спонтанных мутаций. Согласно концепции «окна селекции мутантов» (ОСМ) появление антибиотикорезистентных мутантов возможно тогда, когда концентрация антибиотика выше его минимальной подавляющей концентрации (МПК), но ниже МПК_М [7]. Моделируемые в динамической системе концентрации антимикробных препаратов в разные интервалы времени могут находиться как за пределами ОСМ, так и внутри него.

Антибиотикотерапия с использованием комбинаций из двух и более антибиотиков может использоваться как для преодоления экстремальной и полной антибиотикорезистентности за счет синергидного антимикробного эффекта, так и для предотвращения развития мутационной устойчивости в процессе лечения. В ходе многочисленных исследований было показано, что эффект сочетанного использования антибиотиков трудно прогнозируем, что требует определения чувствительности к комбинациям антибиотиков для подбора наиболее эффективных комбинаций [8]. Данные о влиянии различных комбинаций антибиотиков на частоту возникновения мутационной устойчивости немногочисленны и противоречивы. С учетом разнообразия механизмов устойчивости бактерий, требуется проведение фармакокинетического моделирования для определения режимов комбинированной антибиотикотерапии, препятствующих возникновению мутационной устойчивости к антибиотикам у клинически значимых микроорганизмов.

В настоящее время для моделирования фармакокинетики антибиотиков *in vitro* применяются статические и динамические системы, например, модели на основе биореакторов, позволяющие контролировать параметры среды (рН, температура, перфузия), многочашечные системы с непрерывным разбавлением, имитирующие элиминацию препаратов, а также микрофлюидные платформы, обеспечивающие высокую точность дозирования [9, 10].

Большинство существующих систем не адаптированы для моделирования режимов селективной деконтаминации. Кроме того, недостаточно изучена валидация таких моделей в сравнении с расчетными фармакокинетическими профилями.

Цель исследования: разработать и создать динамическую проточную систему, моделирующую режимы энтерального введения антимикробных лекарственных средств.

Материалы и методы исследования. Сконструирована однокамерная динамическая проточная система, моделирующая энтеральное поступление антибиотиков в толстый кишечник (рисунок 1). Система представляет собой стеклянные флаконы, закрытые силиконовыми пробками с вмонтированными в них патрубками, и соединенные между собой силиконовыми шлангами.

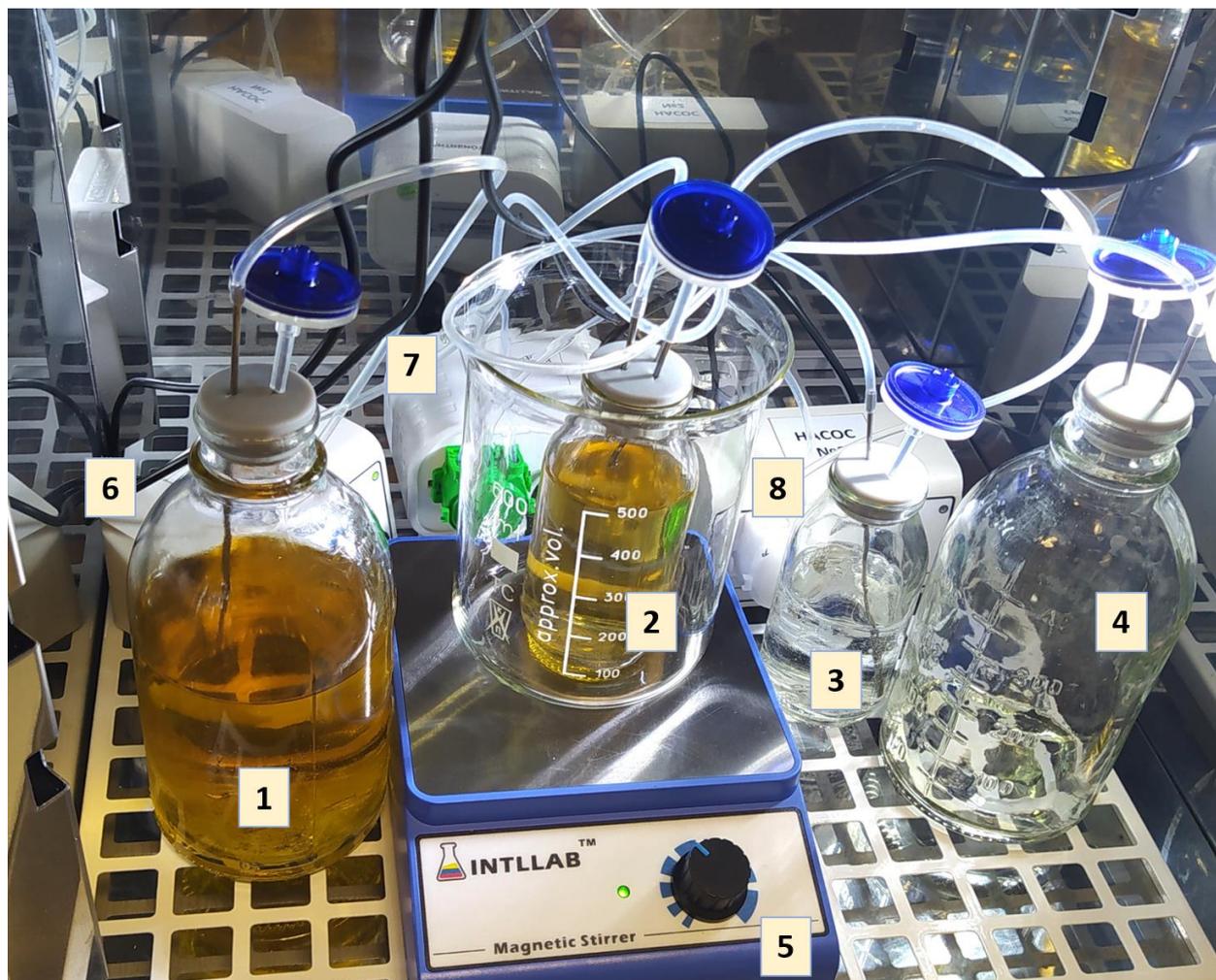
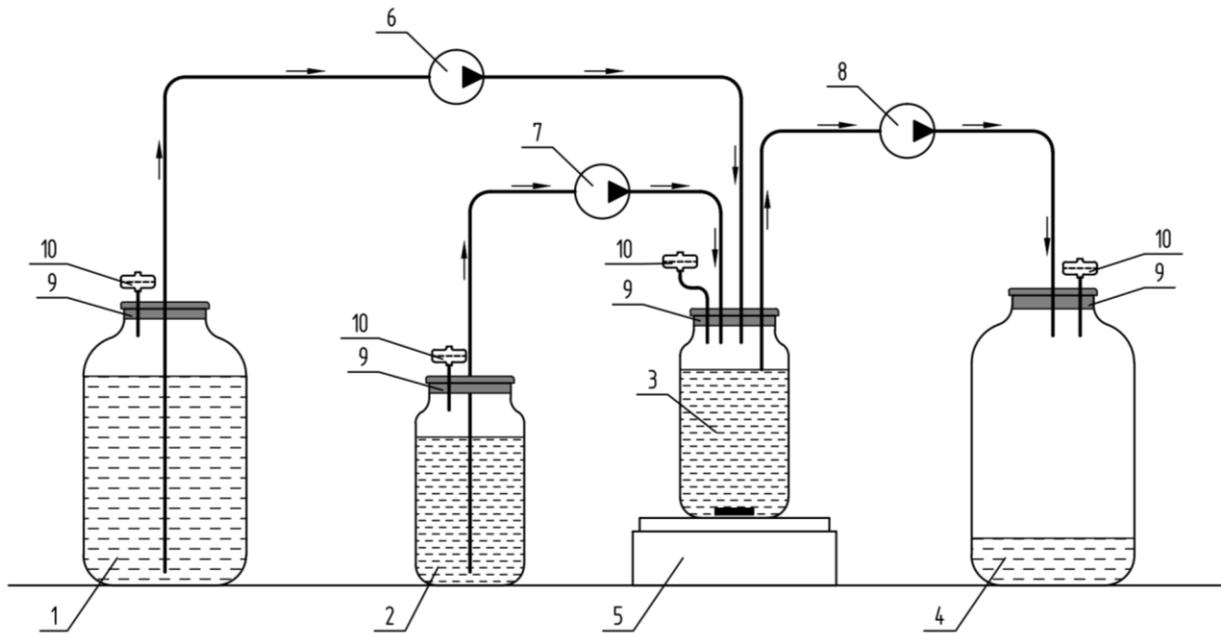


Рисунок 1. Однокамерная динамическая модель селективной деконтаминации кишечника

1 – флакон с питательной средой для подачи в основную камеру; 2 – основная камера; 3 – раствор антибиотика; 4 – флакон для сброса из основной камеры; 5 – магнитный смеситель; 6, 7, 8 – дистанционно управляемые перистальтические насосы

В составе системы 4 емкости: емкость с питательной средой (бульон Мюллера-Хинтон, триптон-соевый бульон или бульон с сердечно-мозговой вытяжкой), емкость с раствором антибиотика, основная камера, совмещенная с магнитным смесителем, и емкость для удаления жидкости из основной камеры. Ток жидкости между емкостями осуществляется при помощи трех дистанционно управляемых перистальтических насосов, обеспечивающих дозирование антибиотика и его контролируемую элиминацию. Все материалы, из которых собрана система, являются термостойкими и стерилизуются воздушным методом (180 °С – 60 мин). Для компенсации давления газа во флаконах в пробки дополнительно вмонтированы патрубки с закрепленными на них бактериальными фильтрами (бактериальные шприц-насадки с диаметром пор 0,22 мкм). Объем основной камеры составляет 40 мл и лимитируется глубиной погружения отводящего патрубка. Объемы флакона с питательной средой и флакона для сброса из основной камеры составляют 500 мл. Принципиальная схема системы представлена на рисунке 2.



1 – флакон со средой для подачи в основную камеру; 2 – раствор антибиотика; 3 – основная камера; 4 – флакон для сброса из основной камеры; 5 – магнитная мешалка; 6, 7, 8 – дистанционно управляемые перистальтические насосы; 9 – пробка силиконовая; 10 – фильтр бактериальный.

Рисунок 2. Дистанционно управляемая программируемая динамическая проточная система, моделирующая режимы энтерального введения антимикробных лекарственных средств в режиме селективной деконтаминации кишечника (принципиальная схема)

Система собирается и стерилизуется, асептично заполняется питательной средой и стерильным раствором антибиотиков. В основную камеру дозированно вносится необходимое количество суспензии тестируемой культуры микроорганизма. Шланги подключаются к перистальтическим насосам. Смонтированная заполненная система устанавливается в камеру термостата и на всем протяжении кинетического эксперимента инкубируется при 35 °С. Перистальтические насосы и магнитный смеситель запускаются и отключаются через WiFi-контроллеры, управляемые дистанционно через мобильное приложение.

Моделирование энтерального поступления колестиметата натрия для однокамерной динамической проточной системы. Выполнено моделирование энтерального введения колестиметата натрия, представляющего собой нерезорбируемый из кишечника пептидный антибиотик. Объем кишечника принимали равным 2000 мл, разовая доза антибиотика по 2 млн МЕ (66 мг), введение антибиотика каждые 8 ч в течение 5 суток. В динамической проточной модели (объем основной камеры 40 мл, масштаб 1 : 50) это соответствовало введению 40 000 МЕ (1,32 мг) каждые 8 часов. Для элиминации антибиотика выполнялась перфузия питательной среды в основной камере с кратностью замещения 5 % (2 мл) в час.

Определение концентраций антибиотика, создаваемой в динамической проточной системе. В качестве модельного антибиотика выбран рифампицин. Методика его количественного определения в растворах – спектрометрия по удельному показателю поглощения. Использовали фармацевтическую субстанцию рифампицина (Rifampicin, Art. No. 4163.3, Carl Roth, Германия). Стоковый раствор рифампицина с концентрацией 100 мг/мл готовили в метаноле, в качестве разбавителя использовали стерильную дистиллированную воду.

Спектры поглощения раствора рифампицина (2 мг/л) оценивали на микропланшетном ридере Infinite M200 (TECAN, Австрия) в диапазоне 300–1000 нм. Данные регистрировали при помощи программы Magellan 6.6 (TECAN). Для определения концентрации рифампицина в растворе подготовлены контрольные образцы в диапазоне концентраций 0–1,25 мг/л, по которым была построена калибровочная кривая.

Для исследования стабильности оптических характеристик раствор рифампицина с концентрацией 2 мг/л хранили при комнатной температуре и ежедневно на протяжении 3 дней определяли концентрацию антибиотика спектрофотометрическим методом.

Результаты и их обсуждение. *Результаты моделирования энтерального поступления колистиметата натрия для однокамерной динамической проточной системы.*

Расчетные моделируемые концентрации колистиметата натрия (энтеральное поступление 66 мг антибиотика каждые 8 часов в течение 5 суток) представлены на рисунке 3. Объем кишечника приняли равным 2000 мл, кратность замещения объема составляла 5 % в час.



Рисунок 3. Моделируемые расчетные концентрации колистиметата натрия в динамической проточной системе

Концентрации антибиотика, создаваемые в динамической проточной системе в различные временные промежутки.

Спектр поглощения рифампицина характеризовался двумя полосами поглощения с максимумами при длинах волн 329 нм и 470 нм (рисунок 4). Исследование стабильности оптических характеристик раствора рифампицина (2 мг/л) показало, что в течение трех суток интенсивность поглощения при 470 нм сохранялась стабильной, что свидетельствует об устойчивости рифампицина в водном растворе.

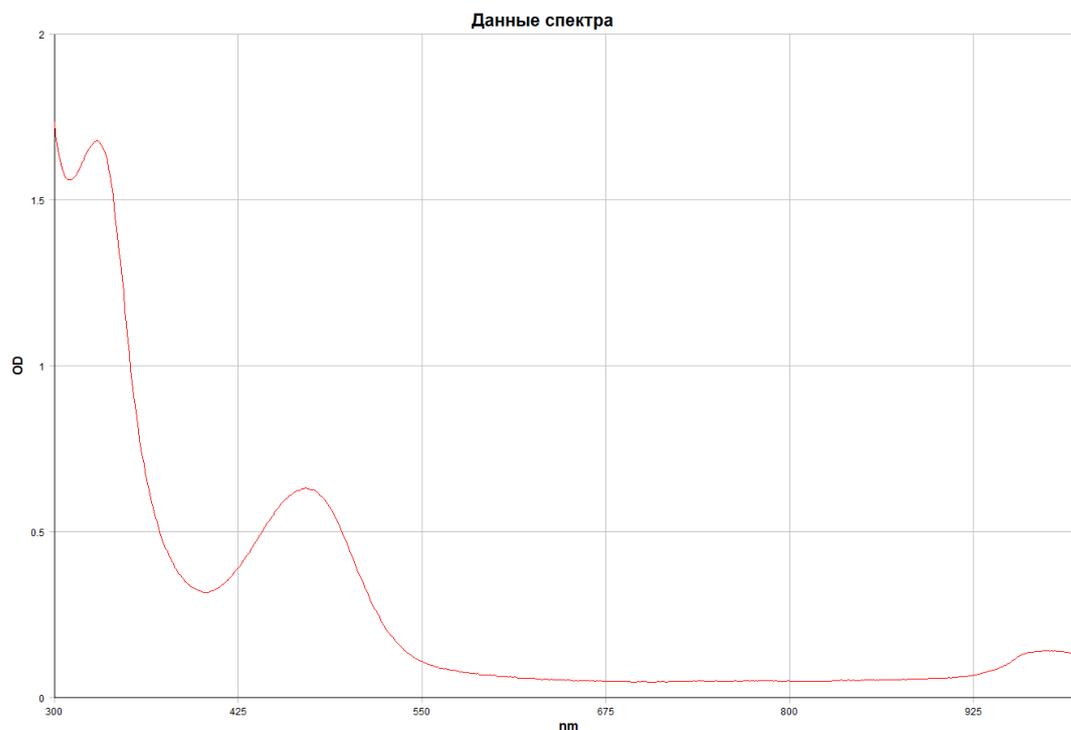


Рисунок 4. Спектр поглощения водного раствора рифампицина

Для определения концентрации рифампицина в растворе подготовлены контрольные образцы и построена калибровочная кривая. С использованием разработанной динамической проточной системы выполнено моделирование энтерального введения рифампицина. Проведена калибровка и настройка динамической проточной системы. Объем кишечника принимали равным 1800 мл, разовая доза антибиотика по 200 мг, введение антибиотика каждые 8 ч в течение 56 ч. Для элиминации антибиотика выполнялась перфузия питательной среды в основной камере с кратностью замещения 5 % (2 мл) в час. Ежечасно в каждом цикле замещения объема отбирался отводящийся из основной камеры раствор. Всего получено 56 образцов (контрольных точек). Для каждого из них с использованием микропланшетного ридера Infinite M200 проведено определение OD₄₇₀ и рассчитана концентрация рифампицина.

Фактические концентрации рифампицина, создаваемые в динамической проточной системе, были определены фотоколориметрическим методом. При сопоставлении расчетных моделируемых концентраций рифампицина и его концентраций, фактически создаваемых динамической проточной системой, получены совпадающие кинетические профили (рисунок 5).

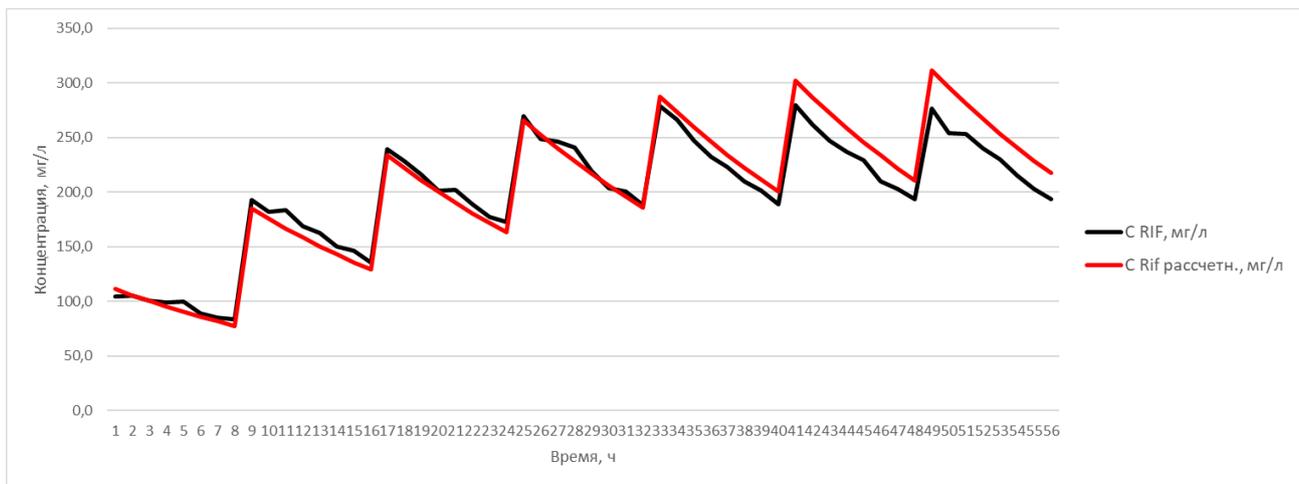


Рисунок 5. Расчетные и фактические концентрации рифампицина в динамической проточной системе

Таким образом, сконструирована и собрана динамическая проточная система, способная в режиме реального времени моделировать пероральное поступление антибиотиков в кишечник и их постепенную элиминацию. С помощью спектрофотокориметрического метода определены концентрации рифампицина, создаваемые в динамической проточной системе в различные временные промежутки. Показано, что создаваемые в динамической проточной системе кинетические профили антибиотика совпадают с расчетными значениями.

Заключение. Сконструирована, собрана и откалибрована динамическая проточная система, способная в режиме реального времени моделировать пероральное поступление антибиотиков в кишечник и их постепенную элиминацию, а также выполнять культивирование исследуемых микроорганизмов в присутствии динамически изменяющихся концентраций антибиотиков. Проведено моделирование энтерального введения колистиметата натрия. Определены спектры поглощения водного раствора рифампицина, определены максимумы поглощения при длинах волн 329 нм и 470 нм. Выполнено моделирование энтерального введения антибиотика. При сопоставлении расчетных моделируемых концентраций рифампицина и его концентраций, фактически создаваемых динамической проточной системой, получены совпадающие кинетические профили. Проведенная спектрофотометрическая валидация кинетики рифампицина подтверждает точность модели.

Разработанная модель позволит оптимизировать режимы дозирования антибиотиков для селективной деконтаминации кишечника, снизить затраты на доклинические исследования и минимизировать использование животных в фармакокинетических экспериментах.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант М24У-002).

Литература:

- [1]. *Lemiech-Mirowska E., Kiersnowska Z., Michalkiewicz M. et al.* Nosocomial infections as one of the most important problems of healthcare system // *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2021. Vol. 28, No. 3. P. 361366.
- [2]. *Барсук А. Л., Некаева Е. С., Ловцова Л. В., Ураков А. Л.* Селективная деконтаминация кишечника как метод профилактики инфекционных осложнений у пациентов с термической травмой (обзор) // *Современные технологии в медицине*. 2020. Т. 12, № 6. С. 86–97.
- [3]. *Rommes H., Taylor N., Petros A. et al.* Selective decontamination of the digestive tract is a four-component strategy // *Intensive Care Medicine*. 2020. Vol. 46, No. 9. P. 1796–1797.
- [4]. *Plantinga N. L., Bonten M.* Selective decontamination and antibiotic resistance in ICUs // *Critical Care*. 2015. Vol. 19, No. 1. P. 1–7.
- [5]. *Wittekamp B. H., Oostdijk E. An., De Smet A. M. Ga., Bonten M. Jm.* Colistin and tobramycin resistance during long-term use of selective decontamination strategies in the intensive care unit: a post hoc analysis // *Critical Care*. 2015. Vol. 19, No. 1. P. 1–6.
- [6]. *Голикова М. В., Струкова Е. Н., Алиева К. Н. и др.* Антимутантная эффективность комбинированной терапии дорипенемом и левофлоксацином: исследования в динамических системах *in vitro* с *Pseudomonas aeruginosa* // *Антибиотики и химиотерапия*. 2021. Т. 66, № 3–4. С. 12–17.
- [7]. *Струкова Е. Н., Смирнова М. В., Востров С. Н. и др.* Прогнозирование развития антибиотикоустойчивости при моделировании клинических режимов дозирования в динамической системе *in vitro* // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2009. Т. 11, № 2. С. 152–160.
- [8]. *Тапальский Д. В.* Чувствительность к комбинациям антибиотиков продуцирующих карбапенемазы нозокомиальных штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в Беларуси // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018. Т. 20, № 3. С. 182–191.
- [9]. *Nielsen E. I., Cars O., Friberg L. E.* Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) indices of antibiotics predicted by a semimechanistic PKPD model: a step toward model-based dose optimization // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011. Vol. 55, No. 10. P. 4619–4630.
- [10]. *Abbott I. J., Roberts J. A., Meletiadis J., Peleg A. Y.* Antimicrobial pharmacokinetics and preclinical *in vitro* models to support optimized treatment approaches for uncomplicated lower urinary tract infections // *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2021. Vol. 19, No. 3. P. 271–295.

D. V. TAPALSKI, M. V. SIMONCHIK, E. V. KARPOVA

PHARMACOKINETIC MODELING OF SELECTIVE DIGESTIVE DECONTAMINATION USING A SINGLE-CHAMBER DYNAMIC FLOW SYSTEM

State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus

Summary

A dynamic flow system was designed, assembled, and calibrated to simulate real-time oral antibiotic delivery into the intestine and their gradual elimination. Enteral administration of colistin and rifampicin was modeled. Comparison of simulated pharmacokinetic concentrations of rifampicin with actual concentrations generated by the dynamic flow system revealed matching kinetic profiles.

Keywords: pharmacokinetics, antibiotics, modeling, digestive decontamination.