

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ORIGINAL PAPER

Προσδιορισμός ορίων ευαισθησίας
βορικοναζόλης για *Aspergillus fumigatus*
με ένα *in vitro* δυναμικό μοντέλο
φαρμακοκινητικής προσομοίωσης

ΣΚΟΠΟΣ Αν και έχουν περιγραφεί στελέχη *Aspergillus fumigatus* με μειωμένη *in vitro* ευαισθησία στη βορικοναζόλη, δεν έχουν ακόμη καθοριστεί επίσημα κλινικά όρια ευαισθησίας. Σκοπό λοιπόν της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η συσχέτιση των αποτελεσμάτων ενός νέου *in vitro* φαρμακοκινητικού (PK)-φαρμακοδυναμικού (PD) μοντέλου με *in vivo* αποτελέσματα πειραματικής ασπεργίλλωσης και η διερεύνηση της δραστηριότητας της βορικοναζόλης έναντι στελεχών *Aspergillus fumigatus* για τον προσδιορισμό ορίων ευαισθησίας. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα κλινικά στελέχη *A. fumigatus*, ένα αγρίου τύπου με MIC 0,25 mg/L και τρία με διακριτές μεταλλάξεις στο γονίδιο *CYP51A* με MICs 0,125, 0,25 και 2 mg/L, τα οποία είχαν μελετηθεί σε πειραματόζωα. Οι *in vivo* δοσολογίες 10, 40 και 80 mg/kg βορικοναζόλης που χρησιμοποιήθηκαν στα πειραματόζωα προσομοιώθηκαν σε ένα νέο *in vitro* PKPD μοντέλο, με μέγιστες συγκεντρώσεις 1,60, 11,09 και 36,49 mg/L, αντίστοιχα, και μέσο χρόνο ημίσειας ζωής 6 ώρες. Για κάθε δοσολογία και στέλεχος προσδιορίστηκε η περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου AUC (PK παράμετρος) και η περιοχή κάτω από την καμπύλη γαλακτομαννάνης-χρόνου AUC_{GI} (PD παράμετρος). Η *in vitro* εκατοστιαία σχέση αντιμυκητιακής δράσης-AUC/MIC συγκρίθηκε με την *in vivo* εκατοστιαία σχέση επιβίωσης-AUC/MIC. Τέλος, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση Monte Carlo 100 ασθενών που λάμβαναν την καθιερωμένη δοσολογία των 4 mg/kg βορικοναζόλης κάθε 12 ώρες και υπολογίστηκε το ποσοστό (%) των ασθενών που πέτυχαν το φαρμακοδυναμικό στόχο AUC/MIC μέγιστης αντιμυκητιακής δράσης για στελέχη *A. fumigatus* με διαφορετικά MICs. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Οι *in vitro* φαρμακοκινητικές παράμετροι και τα ποσοστά αντιμυκητιακής δράσης ήταν παραπλήσιες με τις αντίστοιχες που παρατηρήθηκαν στα πειραματόζωα (paired t test p=0,4). Η *in vitro* εκατοστιαία σχέση της μυκητιακής ανάπτυξης-AUC/MIC ακολουθούσε σιγμοειδή καμπύλη παρόμοια με αυτή που βρέθηκε στα πειραματόζωα (R²=0,91). Η PK/PD παράμετρος AUC₀₋₂₄/MIC που αντιστοιχούσε στο 50% της μέγιστης αντιμυκητιακής δράσης στο *in vitro* μοντέλο ήταν 11,53 (εύρος 8-16), πολύ κοντά στο *in vivo* AUC₀₋₂₄/MIC 10,5 που βρέθηκε σε πειραματόζωα με βάση τα ελεύθερα μη-πρωτεΐνοσυνδεδεμένα μόρια βορικοναζόλης (FAUC/MIC). Η Monte Carlo προσομοίωση έδειξε ότι ο φαρμακοδυναμικός στόχος 56 FAUC/MIC, ο οποίος σχετίζεται με μέγιστη αντιμυκητιακή δράση, επιτυγχάνεται σε μεγάλο ποσοστό ασθενών (>80%) με την καθιερωμένη δοσολογία της βορικοναζόλης για στελέχη *A. fumigatus* με MIC ≤0,25 mg/L, τα οποία θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ευαίσθητα, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για στελέχη *A. fumigatus* με MIC ≥1 mg/L είναι <5%, υποδηλώνοντας αντοχή στη βορικοναζόλη. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Τα αποτελέσματα του νέου *in vitro* PKPD μοντέλου είναι συγκρίσιμα με αυτά που προέρχονται από πειραματόζωα. Ανάλυση της δράσης της βορικοναζόλης σε αυτό το μοντέλο έδειξε ότι όρια ευαισθησίας ≤0,25, 0,5 και ≥1 θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση ευαίσθητων, μετρίως ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών *A. fumigatus*.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2013, 30(1):35-45
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2013, 30(1):35-45

Μ. Σιώπη,
Α. Ελεφάντη,
R. Al-Saigh,
N. Σιαφάκας,
Λ. Ζέρβα,
I. Μελετιάδης

Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας,
«Αττικό» Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή,
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών, Αθήνα

Determination of the sensitivity
limits to voriconazole of
Aspergillus fumigatus in an
in vitro pharmacokinetic-
pharmacodynamic simulation
model

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Αντοχή
Aspergillus fumigatus
Βορικοναζόλη
Monte Carlo προσομοίωση
Όρια ευαισθησίας

Υποβλήθηκε 26.7.2012
Εγκρίθηκε 31.7.2012

Τα τελευταία χρόνια, η συχνότητα εμφάνισης κρουσμάτων διηθητικής ασπεργίλλωσης έχει αυξηθεί, ιδιαίτερα σε ασθενείς με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως οι ασθενείς με σοβαρές αιματολογικές κακοήθειες και αυτοί που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Η διηθητική ασπεργίλλωση αποτελεί μια σοβαρή λοίμωξη, δεδομένου ότι συνδέεται με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας παρά τη χορήγηση κατάλληλης αντιμυκητιακής θεραπείας.¹ Ο σαπροφυτικός μύκητας *Aspergillus fumigatus* ευθύνεται για την πλειοψηφία των περιπτώσεων, ενώ ως θεραπεία εκλογής χορηγείται η βορικοναζόλη, που ανήκει στην κατηγορία των τριαζολών δεύτερης γενιάς.^{2,3} Ανάμεσα στους παράγοντες που επηρεάζουν την έκβαση της λοίμωξης συγκαταλέγεται η μη έγκαιρη διάγνωσή της, η καθυστερημένη χορήγηση κατάλληλης αντιμυκητιακής θεραπείας, οι υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου, καθώς και η εμφάνιση αντοχής.^{4,5}

Έχουν περιγραφεί δύο τύποι αντοχής στις αζόλες: η επίκτητη, η οποία εμφανίζεται συνήθως ως συνέπεια της μακροχρόνιας θεραπείας με αντιμυκητιακά, και η εγγενής, που αποτελεί ένα κληρονομικό χαρακτηριστικό των στελεχών.⁶ Το γεγονός ότι αζολο-ανθεκτική ασπεργίλλωση έχει αναφερθεί ακόμη και σε ασθενείς που δεν λάμβαναν αζόλες υποδηλώνει ότι η αντοχή στη δεδομένη κατηγορία φαρμάκων δεν αναπτύσσεται αποκλειστικά κατά τη διάρκεια θεραπείας.⁷ Συγκεκριμένα, η αντοχή στις αζόλες φαίνεται ότι παρουσιάζεται μέσω της έκθεσης του μύκητα σε ενώσεις αζολών ως αποτέλεσμα είτε της παρατεταμένης χορήγησής τους σε ασθενείς είτε της χρήσης τους ως μυκητοκτόνα στην καθημερινή πράξη με σκοπό τη φυτοπροστασία και τη συντήρηση υλικών.⁸⁻¹⁰ Σε στελέχη *A. fumigatus* έχουν αναγνωριστεί μονο-, πολυ- και παν-ανθεκτικοί στις αζόλες φαινότυποι, όπου οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs) είναι υψηλές σε μία μόνο, σε περισσότερες από μία αλλά όχι όλες και σε όλες τις διαθέσιμες αζόλες, αντίστοιχα.¹¹ Ο βασικός μηχανισμός αντοχής στις αζόλες στον *A. fumigatus* αποδίδεται σε τροποποιήσεις του γονιδίου-στόχου *CYP51A*, με μια ποικιλία σημειακών μεταλλάξεων, που βρέθηκαν σε κλινικά στελέχη, να έχουν συσχετιστεί με διαφορετικά προφίλ ευαισθησίας *in vitro*.¹¹

Τα αυξανόμενα ποσοστά εμφάνισης αζολο-ανθεκτικών κλινικών στελεχών *A. fumigatus* αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα, επειδή οι λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτά δεν ανταποκρίνονται στην αντιμυκητιακή θεραπεία.⁶ Επίσημα *in vitro* όρια ευαισθησίας δεν έχουν καθοριστεί ακόμη σαφώς και ο συσχετισμός τους με το κλινικό αποτέλεσμα δεν έχει τεκμηριωθεί. Ως αποτέλεσμα, το πρόβλημα της αντοχής, οι μηχανισμοί πρόκλησής της και η κλινική σημασία της είναι αντικείμενα εντατικής έρευνας.

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της δραστηριότητας της βορικοναζόλης έναντι στελεχών *A. fumigatus* με διαφορετική *in vitro* ευαισθησία και μηχανισμούς αντοχής χρησιμοποιώντας ένα νέο *in vitro* φαρμακοκινητικό-φαρμακοδυναμικό (PKPD) μοντέλο, το οποίο προσομοιώνει τη φαρμακοκινητική των αντιμυκητιακών φαρμάκων *in vivo*. Το νέο *in vitro* μοντέλο αρχικά αξιολογήθηκε με βάση τα δεδομένα από πειραματικό μυϊκό μοντέλο διάσπαρτης ασπεργίλλωσης και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό ορίων ευαισθησίας στη βορικοναζόλη, με Monte Carlo προσομοίωση.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Στελέχη

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα κλινικά στελέχη *A. fumigatus* που παραχωρήθηκαν ευγενικά από τον καθηγητή Paul Verweij, Πανεπιστημιακό Ιατρικό Κέντρο στο Nijmegen της Ολλανδίας. Τα στελέχη αυτά μελετήθηκαν προηγουμένως και χαρακτηρίστηκαν αναλυτικά ως προς την παρουσία αντοχής στις αζόλες με φαινοτυπικές και μοριακές μεθόδους.¹² Η φαινοτυπική ευαισθησία τους στη βορικοναζόλη ελέγχθηκε με την πρότυπη μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζυμό του CLSI, τη μέθοδο M38-A2.¹³ Το ένα στέλεχος (8196) αποτελούσε αγρίου τύπου στέλεχος με MIC βορικοναζόλης 0,25 mg/L, ενώ στα υπόλοιπα (5973, 2877 και 5235) ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *CYP51A* μετά από ανάλυση της αλληλουχίας του (G54W, M220I και TR/L98H) και οι MICs αντιστοιχούσαν σε 0,125, 0,25 και 2 mg/L. Τα συγκεκριμένα στελέχη επιλέχθηκαν δεδομένου ότι αφ' ενός χρησιμοποιήθηκαν προηγούμενα σε πειραματικό μοντέλο διάσπαρτης ασπεργίλλωσης σε ποντικούς και αφ' ετέρου παρουσίασαν διαφορετικό θεραπευτικό αποτέλεσμα της βορικοναζόλης, το οποίο ήταν ανάλογο με τις τιμές MICs.¹²

Τα στελέχη αποθηκεύτηκαν σε 10% διάλυμα γλυκερόλης στους -70 °C και ανακαλλιεργήθηκαν σε Sabouraud dextrose άγαρ (SDA) με 0,02% χλωραμφενικόλης για 5-7 ημέρες στους 35 °C. Εναιώρημα κονιδίων παρασκευάστηκε σε 10 mL στείρου φυσιολογικού ορού με 1% Tween 20 και στη συνέχεια ο αριθμός τους ανά mL προσδιορίστηκε με τη βοήθεια της πλάκας Neubauer προκειμένου να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση εναιωρήματος 10³ CFU/mL, η οποία επιβεβαιωνόταν σε κάθε σειρά πειραμάτων με την επίστρωση ορισμένου όγκου εναιωρήματος σε SDA.

Αντιμυκητιακός παράγοντας

Καθαρή ουσία βορικοναζόλης (Pfizer Inc) διαλύθηκε σε στείρο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε αρχική συγκέντρωση 10 mg/mL και διατηρήθηκε στους -70 °C μέχρι τη χρήση της.

Θρεπτικό υλικό

Το θρεπτικό υλικό περιείχε 10,4 g/L RPMI 1640 με L-γλουταμίνη χωρίς δικαρβονικό νάτριο, ρυθμισμένο σε pH 7,0 με 0,165 M

μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ (MOPS) και 100 mg/L χλωραμφενικόλη (AppliChem, Darmstadt, Germany).

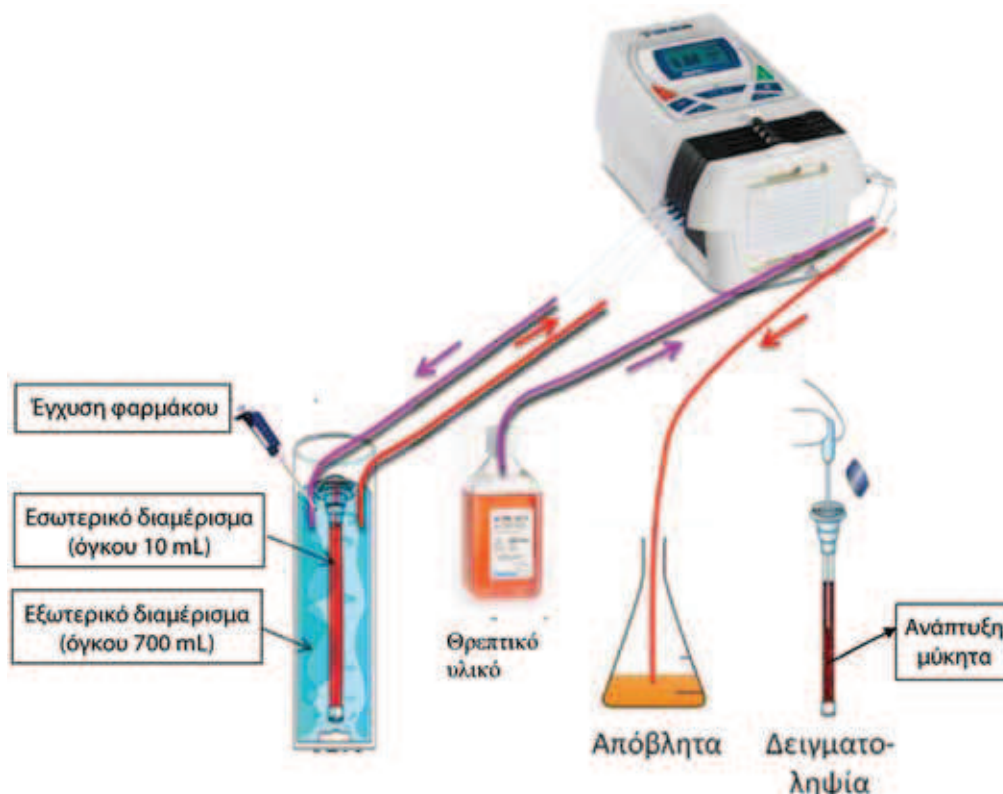
In vitro φαρμακοκινητικό/φαρμακοδυναμικό μοντέλο

Χρησιμοποιήθηκε ένα νέο *in vitro* μοντέλο, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως από την ομάδα μας, το οποίο προσομοιώνει τη φαρμακοκινητική αντιμυκητιακών φαρμάκων στην κυκλοφορία αίματος του ανθρώπου και μελετά την επίδρασή τους στην ανάπτυξη στελεχών *Aspergillus* (εικ. 1).¹⁴ Πρόκειται για ένα μοντέλο δύο διαμερισμάτων που επιτρέπει την έκθεση αναπτυσσόμενων στελεχών σε μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις φαρμάκου. Το εξωτερικό διαμέρισμα (ΕΞΔ) αποτελείται από ένα γυάλινο δοχείο που περιέχει 700 mL θρεπτικού υλικού και προσομοιώνει την κυκλοφορία του αίματος. Το εσωτερικό διαμέρισμα (ΕΣΔ) είναι ένας σωλήνας διάχυσης όγκου 10 mL (Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2, Spectrum Laboratories Inc, USA) κατασκευασμένος από ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης που επιτρέπει την ελεύθερη διέλευση μορίων με μοριακό βάρος <20 kD, ο οποίος τοποθετείται εντός του ΕΞΔ προσομοιώνοντας το αναπνευστικό βρογχόλιο. Έπειτα από την έγχυση του φαρμάκου στο ΕΞΔ, μια περισταλτική αντλία (Minipuls Evolution®, Gilson Inc) εισάγει στο δοχείο θρεπτικό υλικό,

ενώ συγχρόνως απομακρύνει το περιεχόμενό του σύμφωνα με το ρυθμό κάθαρσης του φαρμάκου, προκειμένου να επέλθει εξισορρόπηση της συγκέντρωσης μεταξύ των δύο διαμερισμάτων και ο όγκος του ΕΞΔ να παραμένει σταθερός. Το εναιώρημα του μύκητα ενοφθαλμίζεται στο ΕΣΔ, στο οποίο αναπτύσσεται εγκλωβισμένος. Το ίδιο συμβαίνει και με τα μεγαλομοριακά του παράγωγα, όπως η γαλακτομαννάνη (μοριακό βάρος 20–60 kD), η αύξηση της συγκέντρωσης της οποίας είναι ανάλογη με το ρυθμό ανάπτυξης του μύκητα.¹⁴ Το σύστημα τοποθετείται σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα (37 °C). Το φάρμακο εισάγεται ταυτόχρονα στο θρεπτικό υλικό των δύο διαμερισμάτων κατά τη χρονική στιγμή 0 για επίτευξη ταχείας εξισορρόπησης συγκέντρωσης, ενώ πριν από την έναρξη κάθε πειράματος ελέγχεται η θερμοκρασία και ο ρυθμός ροής.

Μικροβιολογική μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης της βορικοναζόλης

Τα επίπεδα του φαρμάκου προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της διάχυσης σε άγαρ, χρησιμοποιώντας ένα κλινικό στέλεχος *Candida parapsilosis* ευαίσθητο στη βορικοναζόλη (MIC: 0,015 mg/L). Συγκεκριμένα, εναιώρημα 24ωρης καλλιέργειας του στελέχους



Εικόνα 1. *In vitro* φαρμακοκινητικό/φαρμακοδυναμικό μοντέλο που προσομοιώνει τη φαρμακοκινητική αντιμυκητιακών φαρμάκων στην κυκλοφορία αίματος του ανθρώπου και μελετά την επίδρασή τους στην ανάπτυξη στελεχών *Aspergillus* (από αναφορά 14). Αποτελείται από (α) ένα γυάλινο δοχείο που περιέχει 700 mL θρεπτικού υλικού (εξωτερικό διαμέρισμα, ΕΞΔ), (β) ένα σωλήνα διάχυσης όγκου 10 mL που επιτρέπει την ελεύθερη διέλευση μορίων με μοριακό βάρος <20 kD, στον οποίο εισάγεται εναιώρημα του μύκητα (εσωτερικό διαμέρισμα, ΕΣΔ) και (γ) μια περισταλτική αντλία που εισάγει θρεπτικό υλικό στο δοχείο, ενώ παράλληλα απομακρύνει το περιεχόμενό του σύμφωνα με το ρυθμό κάθαρσης του φαρμάκου από την κυκλοφορία του αίματος.

(3×10^5 CFU/mL) ενοφθαλμίστηκε σε θρεπτικό υλικό (RPMI 1640, 0,165M MOPS, pH 7,0) με 15 g/L άγαρ (Oxoid Ltd, Basingstoke, England) αμέσως μετά από την παρασκευή του τελευταίου και όταν η θερμοκρασία κατήλθε στους 54 °C. Κατόπιν της στερεοποίησης του υλικού σε αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία 10×10 cm σε θερμοκρασία δωματίου, ανοίχθηκαν σπές διαμέτρου 1 cm, στις οποίες μεταγγίστηκαν 100 μL υποδιπλάσιων αραιώσεων του φαρμάκου, με εύρος συγκεντρώσεων 0,25–16 mg/L, καθώς και των δειγμάτων του *in vitro* μοντέλου. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37 °C για 48 ώρες και μετρήθηκε η διάμετρος των ζωνών αναστολής που σχηματίστηκαν. Τέλος, με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression) προσδιορίστηκε η πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων βορικοναζόλης-διαμέτρων αναστολής, από την οποία προσδιορίστηκε ακολούθως η συγκέντρωση της βορικοναζόλης στα εξεταζόμενα δείγματα.

Φαρμακοκινητικές μελέτες

Οι δοσολογίες της βορικοναζόλης 10, 40 και 80 mg/kg που χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως σε πειραματικό μοντέλο διάσπαρτης ασπεργίλλωσης σε ποντικούς, με μέγιστες συγκεντρώσεις πλάσματος 1,61, 11,81 και 35,86 mg/L, αντίστοιχα, και μέσο χρόνο ημίσειας ζωής 6 ωρών¹² προσομοιώθηκαν στο *in vitro* PKPD μοντέλο. Το διάλυμα του φαρμάκου ενέθηκε και στα δύο διαμερίσματα τη χρονική στιγμή 0 (εφ' άπαξ δόση). Στις 0, 3, 6, 12 και 24 ώρες πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες (200 μL) τόσο από το ΕΣΔ όσο και από το ΕΞΔ για τον προσδιορισμό των επιπέδων του φαρμάκου. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -70 °C μέχρι την ανάλυση.

Φαρμακοδυναμικές μελέτες

Εναιώρημα κονιδίων κάθε εξεταζόμενου στελέχους (10^3 CFU/mL) ενοφθαλμίστηκε στο ΕΣΔ του *in vitro* μοντέλου και επωάστηκε για 48 ώρες. Προκαταρκτικά πειράματα διαφορετικών συγκεντρώσεων κονιδίων (10^5 και 10^3 CFU/mL) υπέδειξαν τη συγκέντρωση 10^3 CFU/mL ως τη βέλτιστη. Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση της βορικοναζόλης στη μυκητιακή ανάπτυξη για κάθε δοσολογικό σχήμα, συλλέχθηκαν 200 μL του διαλύματος των σωλήνων διάχυσης κάθε 6–12 ώρες και προσδιορίστηκε ο δείκτης γαλακτομαννάνης (galactomannan index, GI) με τη βοήθεια της ανοσοενζυμικής δοκιμασίας Platelia *Aspergillus* EIA (Bio-Rad Laboratories). Ο δείκτης γαλακτομαννάνης εκφράζει τη μυκητιακή ανάπτυξη, αφού υψηλή ανάπτυξη αντιστοιχεί σε μεγάλο δείκτη γαλακτομαννάνης.¹⁴ Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -70 °C μέχρι την ανάλυση.

Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Φαρμακοκινητική. Τα φαρμακοκινητικά δεδομένα αναλύθηκαν με μη γραμμική παλινδρόμηση (nonlinear regression) σύμφωνα με την κινητική πρώτης τάξης που περιγράφεται από την εξίσωση $C = C_0 \cdot e^{-kt}$, όπου C είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου σε μια δεδομένη χρονική στιγμή t , C_0 είναι η αρχική συγκέντρωση του φαρμάκου τη χρονική στιγμή t_0 και k είναι η σταθερά του ρυθμού απομάκρυνσης του φαρμάκου. Ο χρόνος ημίσειας ζωής υπολογί-

στηκε από τη σχέση $t_{1/2} = 0,693/k$. Η μέγιστη συγκέντρωση C_0 και ο χρόνος ημίσειας ζωής $t_{1/2}$ στο *in vitro* μοντέλο συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες παραμέτρους που περιγράφηκαν προηγουμένως σε πειραματόζωα (22) χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *t*-test.

Φαρμακοδυναμική. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve, AUC) συγκέντρωσης φαρμάκου-χρόνου (φαρμακοκινητική παράμετρος) και δείκτη γαλακτομαννάνης-χρόνου (φαρμακοδυναμική παράμετρος) προσδιορίστηκαν για την εκάστοτε δόση βορικοναζόλης και κάθε στέλεχος, για το χρονικό διάστημα των 48 ωρών. Το ποσοστό της μυκητιακής ανάπτυξης για κάθε δόση φαρμάκου υπολογίστηκε ως $AUC_{GI,VRC}/AUC_{GI,GC}$, όπου οι παράμετροι $AUC_{GI,VRC}$ και $AUC_{GI,GC}$ αναφέρονται στην AUC της συγκέντρωσης γαλακτομαννάνης-χρόνου για μια δεδομένη δόση βορικοναζόλης (voriconazole, VRC) και της ανάπτυξης του δείγματος-μαρτύρα χωρίς φάρμακο (growth control, GC), αντίστοιχα. Το ποσοστό μυκητιακής ανάπτυξης που παρατηρήθηκε στο *in vitro* μοντέλο για κάθε δοσολογία και στέλεχος συγκρίθηκε με το ποσοστό θνητότητας σε ποντικούς που βρέθηκε προηγουμένως για το ίδιο στέλεχος και την αντίστοιχη δοσολογία με τη δοκιμασία paired *t* test. Τέλος, ο λόγος AUC/MIC και το ποσοστό αντιμυκητιακής δράσης ($100\% - \%$ μυκητιακής ανάπτυξης) υπολογίστηκε ξεχωριστά για κάθε στέλεχος. Η *in vitro* καμπύλη του ποσοστού αντιμυκητιακής δράσης-AUC/MIC αναλύθηκε με μη γραμμική παλινδρόμηση, με βάση το μοντέλο E_{max} το οποίο περιγράφεται από την εξίσωση $E = E_{max} \times PD^{\gamma} / (PD_{50} + PD^{\gamma})$, όπου E είναι το ποσοστό αντιμυκητιακής δράσης (εξαρτημένη μεταβλητή), E_{max} το μέγιστο ποσοστό αντιμυκητιακής δράσης, PD η τιμή AUC/MIC (ανεξάρτητη μεταβλητή), PD_{50} η τιμή AUC/MIC που αντιστοιχεί στο 50% του E_{max} και γ η κλίση της καμπύλης. Στη συνέχεια, η τιμή PD_{50} συγκρίθηκε με την αντίστοιχη τιμή PD_{50} για την καμπύλη επιβίωσης-AUC/MIC που βρέθηκε στο πειραματικό μοντέλο διάσπαρτης ασπεργίλλωσης,¹² λαμβάνοντας υπ' όψη το ποσοστό πρωτεϊνοσύνδεσης (58%) που εμφανίζει η βορικοναζόλη στον ορό των ποντικών.

Προσομοίωση κατά Monte Carlo. Για τον προσδιορισμό των ορίων ευαισθησίας και αντοχής στη βορικοναζόλη χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* PKPD συσχέτιση ως εξής: Με προσομοίωση Monte Carlo προσομοιώθηκαν τα αντίστοιχα δεδομένα 100 ενηλίκων που λάμβαναν την καθιερωμένη δοσολογία βορικοναζόλης των 4 mg/kg δύο φορές την ημέρα ενδοφλέβια, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες μελέτες.¹⁵ Σύμφωνα με αυτές, το συγκεκριμένο σχήμα βορικοναζόλης αντιστοιχεί σε τιμή περιοχής κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης των ελεύθερων (free, f), δηλαδή μη πρωτεϊνοσυνδεδεμένων μορίων βορικοναζόλης-χρόνου ($fAUC_{0-24}$) 24,8 (13–46,7) mg*h/L. Χρησιμοποιήθηκε η τιμή $fAUC_{0-24}$ των ελεύθερων μορίων και όχι η συνολική τιμή $tAUC_{0-24}$, δεδομένου ότι στο *in vitro* μοντέλο μελετάται αποκλειστικά η δράση των ελεύθερων μορίων βορικοναζόλης (λόγω απουσίας των πρωτεϊνών του ορού). Ως φαρμακοδυναμικός στόχος χρησιμοποιήθηκε η τιμή $fAUC/MIC$ που σχετιζόταν με μέγιστη αντιμυκητιακή δράση (80%). Προκειμένου να προσδιοριστούν όρια ευαισθησίας και αντοχής για τα τέσσερα στελέχη *A. fumigatus* που παρουσίαζαν διάφορες τιμές MICs, υπολογίστηκε το ποσοστό των ασθενών που πέτυχαν το φαρμακοδυναμικό στόχο με βάση την $fAUC$ στον ορό. Ως όριο ευαισθησίας ορίστηκε η MIC με ποσοστό ασθενών που πέτυχαν

το φαρμακοδυναμικό στόχο >80% και ως όριο αντοχής ορίστηκε η MIC με ποσοστό ασθενών που πέτυχαν το φαρμακοδυναμικό στόχο <10%.

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού προγράμματος GraphPad Prism, έκδοση 5.0, για Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον δύο φορές.

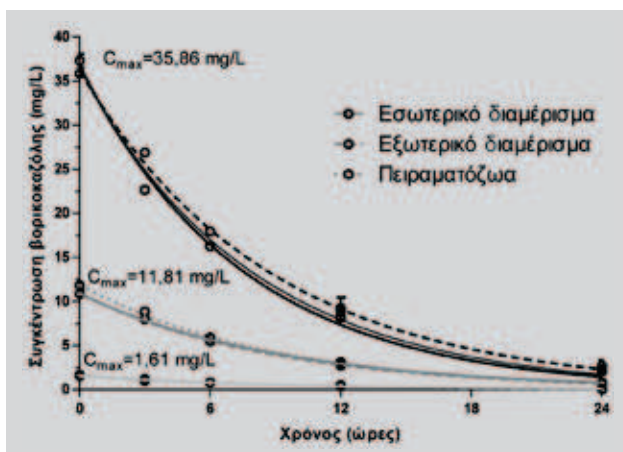
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αξιολόγηση μικροβιολογικής μεθόδου για τον προσδιορισμό επιπέδων βορικοναζόλης

Η αναλυτική ευαισθησία της τεχνικής ήταν 0,25 mg/L. Η διάμετρος των ζωνών συσχέτιστηκε γραμμικά με τη συγκέντρωση ($R^2=0,98$) και ανιχνεύτηκε καλή επαναληψιμότητα με συντελεστή μεταβλητότητας 9% στις χαμηλές μέχρι 12% στις υψηλές συγκεντρώσεις.

Φαρμακοκινητική ανάλυση

Τα αποτελέσματα της φαρμακοκινητικής ανάλυσης για κάθε προσομοιωμένη δοσολογία βορικοναζόλης 10, 40 και 80 mg/kg παρουσιάζονται στην εικόνα 2. Συγκεκριμένα, οι τιμές των μέγιστων συγκεντρώσεων και των τιμών AUC_{0-24} ήταν 1,60, 11,09 και 36,49 mg/L και 13,46, 97,47 και 296,0 mg×h/L, αντίστοιχα, με μέσο χρόνο ημίσειας ζωής 6,2 ώρες (6–6,4 ώρες) για κάθε δοσολογία. Οι τιμές αυτές ήταν παραπλήσιες με τις αντίστοιχες που καταγράφηκαν



Εικόνα 2. Φαρμακοκινητική ανάλυση προηγούμενων δεδομένων χορήγησης δόσεων βορικοναζόλης 10, 40 και 80 mg/kg (κάτω, μέση και άνω καμπύλη) σε ποντικούς (μέση τιμή $t_{1/2}=7,6$ ώρες και μέγιστες συγκεντρώσεις 35,86, 11,81 και 1,61 mg/L) (12) συγκριτικά με τα αντίστοιχα ευρήματα προσομοιωμένης δοσολογίας στο *in vitro* φαρμακοκινητικό/φαρμακοδυναμικό μοντέλο (μέση τιμή $t_{1/2}=6,2$ ώρες και μέγιστες συγκεντρώσεις 36,49, 11,09 και 1,60 mg/L).

προηγούμενως στα πειραματόζωα με μέγιστες συγκεντρώσεις 1,61, 11,81, 35,86 mg/L, τιμές AUC_{0-24} 3,05, 70,12 και 294,61 mg×h/L και μέσο χρόνο ημίσειας ζωής 7,6 ώρες (1,7–16 ώρες).¹²

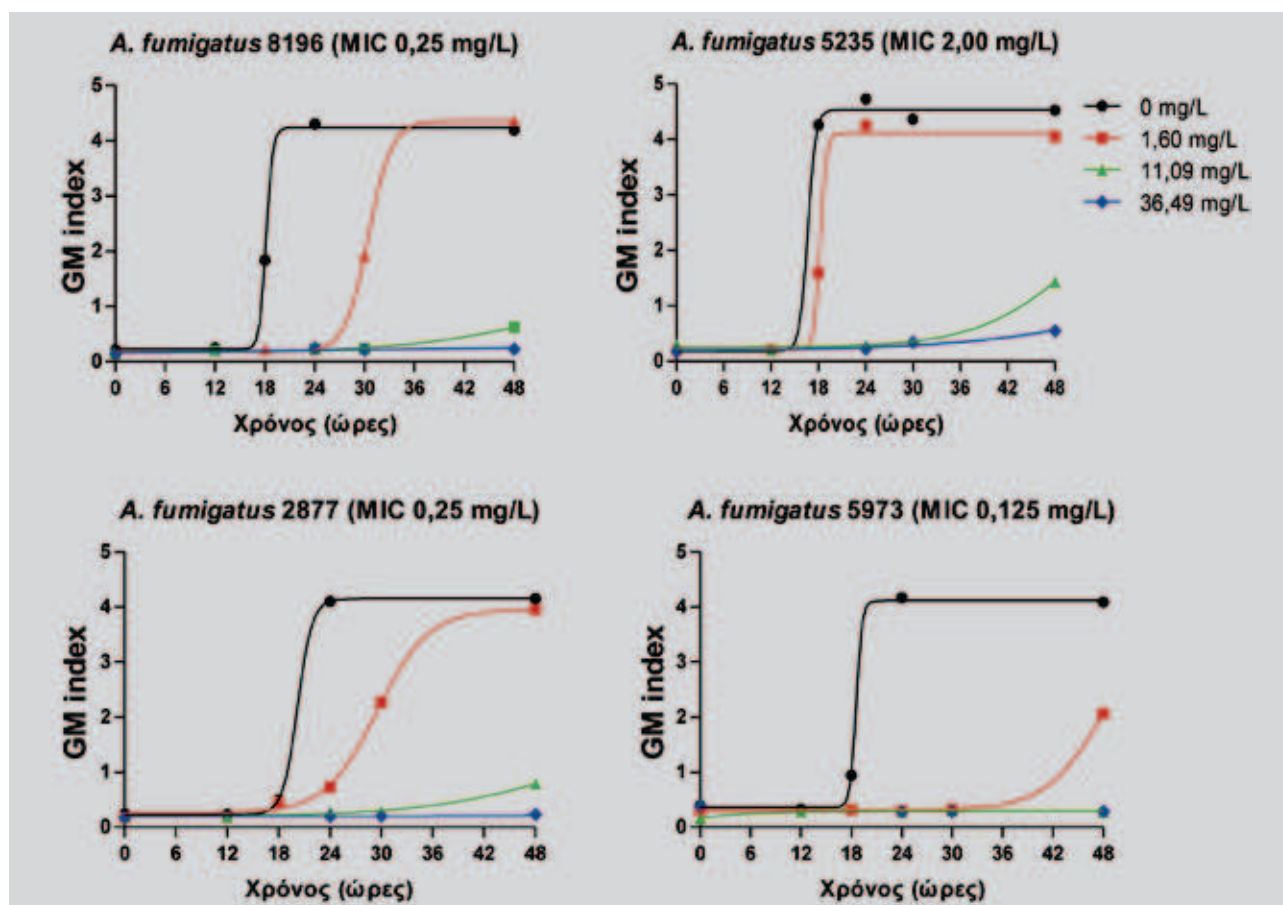
Φαρμακοδυναμική ανάλυση

Τα φαρμακοδυναμικά δεδομένα των προσομοιωμένων δόσεων βορικοναζόλης έναντι των τεσσάρων κλινικών στελεχών *A. fumigatus* παρουσιάζονται στην εικόνα 3. Βρέθηκε ότι το μοντέλο E_{max} περιγράφει πολύ ικανοποιητικά τα δεδομένα (συντελεστές $R^2 >0,93$).

Γενικά, παρατηρήθηκε ότι ο δείκτης γαλακτομαννάνης μειωνόταν σταδιακά με την έκθεση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις βορικοναζόλης και καθώς αυξανόταν η MIC των εξεταζομένων στελεχών. Τα ποσοστά μυκητιακής ανάπτυξης ($AUC_{GI,VRC}/AUC_{GI,GC}$) για κάθε στέλεχος στο *in vitro* μοντέλο δεν διέφεραν σημαντικά από τα αντίστοιχα *in vivo* δεδομένα σε πειραματόζωα, όπως φαίνεται στον πίνακα 1 (paired t test $p=0,4$). Συγκεκριμένα, το ποσοστό μυκητιακής ανάπτυξης για την προσομοιωμένη δοσολογία 80 mg/kg ήταν $\leq 10\%$ στο *in vitro* μοντέλο, ενώ το ποσοστό θνητότητας σε πειραματόζωα ήταν 0%. Αντίθετα, για τη δοσολογία των 10 mg/kg το ποσοστό μυκητιακής ανάπτυξης στο *in vitro* μοντέλο ήταν $\geq 47\%$, ενώ το ποσοστό θνητότητας ανερχόταν σε ποσοστό $\geq 90\%$. Στην ενδιάμεση δοσολογία των 40 mg/kg εμφανίζονταν χαμηλά ποσοστά μυκητιακής ανάπτυξης *in vitro* (2–15%) και θνητότητας *in vivo* (0–10%) με τη μοναδική εξαίρεση του στελέχους 5235 (αντίστοιχα ποσοστά: 28% και 55%), το οποίο παρουσίαζε και την υψηλότερη τιμή MIC βορικοναζόλης (2,0 mg/L).

Οι επί μέρους διαφορές μεταξύ *in vitro* και *in vivo* αποτελεσμάτων μειώθηκαν όταν η ανάλυση έγινε με βάση τη φαρμακοκινητική/φαρμακοδυναμική παράμετρο AUC/MIC , η οποία εξομαλύνει τις διαφορές των συγκεντρώσεων μεταξύ *in vitro* και *in vivo* φαρμακοκινητικής και των τιμών MIC μεταξύ των στελεχών, όπως φαίνεται παρακάτω.

Τέλος, υπολογίστηκε η φαρμακοδυναμική παράμετρος $fAUC/MIC$ ξεχωριστά για κάθε στέλεχος, τα δεδομένα μετατράπηκαν σε τιμές \log_{10} και παραστήθηκαν γραφικά σε συνάρτηση με το ποσοστό της αντιμυκητιακής δράσης (100%–% μυκητιακής ανάπτυξης) (εικ. 4). Όλα τα δεδομένα αντιμυκητιακής δράσης- AUC/MIC περιγράφηκαν πολύ ικανοποιητικά από το μοντέλο E_{max} ($R^2=0,91$) ανεξάρτητα της τιμής MIC και της δοσολογίας, γεγονός που σημαίνει ότι η PKPD παράμετρος που περιγράφει τη δράση της βορικοναζόλης είναι ο λόγος AUC_{0-24}/MIC . Ο λόγος αυτός στο *in vitro* μοντέλο αντιστοιχούσε σε 11,53 (8–16) και ήταν παραπλήσιος της τιμής $fAUC_{0-24}/MIC$ 10,5 που βρέ-

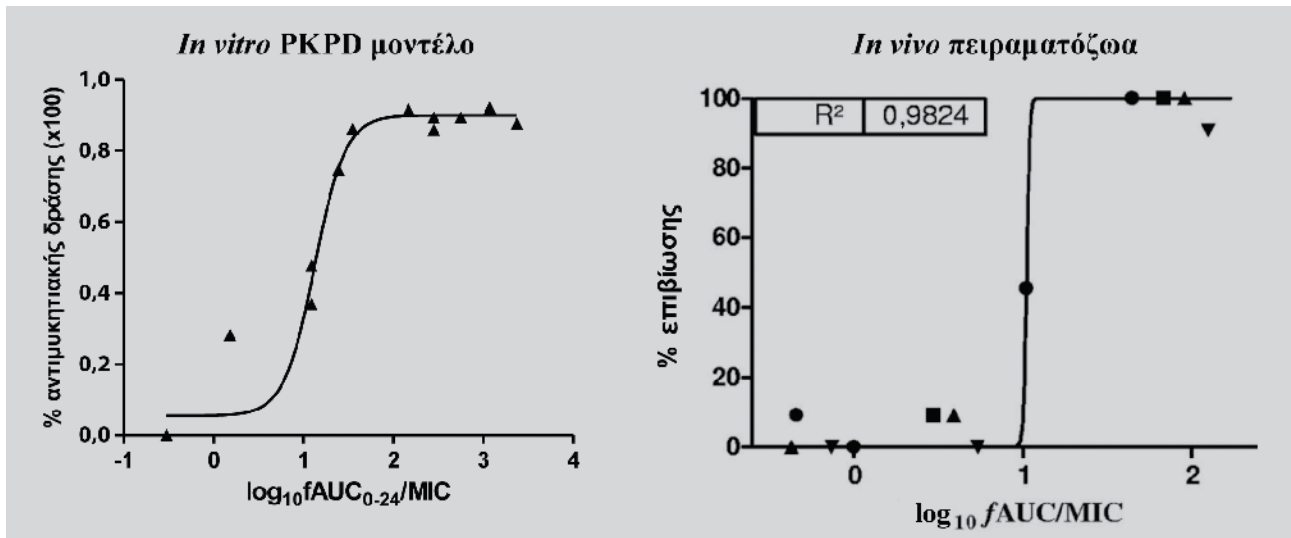


Εικόνα 3. Φαρμακοδυναμική ανάλυση των προσομοιωμένων δόσεων βορικοναζόλης έναντι κλινικών στελεχών *A. fumigatus* (8196: αγρίου τύπου, 5973, 2877 και 5235: μεταλλαγμένα) στο *in vitro* φαρμακοκινητικό/φαρμακοδυναμικό μοντέλο. Τα σχήματα αντιστοιχούν στους δείκτες γαλακτομαννάνης (GI) απουσία φαρμάκου (σφαίρα) και παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων βορικοναζόλης (τετράγωνο, τρίγωνο και ρόμβος), ενώ οι γραμμές στις καμπύλες της μη γραμμικής παλινδρόμησης σύμφωνα με το E_{max} μοντέλο.

Πίνακας 1. Ποσοστά μυκητιακής ανάπτυξης για κάθε στέλεχος *A. fumigatus* και προσομοιωμένη δόση βορικοναζόλης στο *in vitro* φαρμακοκινητικό/φαρμακοδυναμικό μοντέλο, καθώς και τα αντίστοιχα μοναδικά δεδομένα από *in vivo* ζωικό μοντέλο.

Προσομοιωμένη δοσολογία βορικοναζόλης	Μέγιστες συγκεντρώσεις	Κλινικά στελέχη <i>A. fumigatus</i>	MIC σε mg/L (μετάλλαξη)	Μυκητιακή ανάπτυξη (%)	
				<i>In vivo</i> θνητότητα*	<i>In vitro</i> μοντέλο**
10 mg/kg	1,61 mg/L	8196	0,25 (WT)	90	75
		5235	2 (TR/L98H)	90	79
		2877	0,25 (M220I)	90	78
		5973	0,125 (G54W)	100	47
40 mg/kg	11,1 mg/L	8196	0,25 (WT)	0	15
		5235	2 (TR/L98H)	55	28
		2877	0,25 (M220I)	0	2
		5973	0,125 (G54W)	10	9
80 mg/kg	35,6 mg/L	8196	0,25 (WT)	0	7
		5235	2 (TR/L98H)	0	3
		2877	0,25 (M220I)	0	8
		5973	0,125 (G54W)	0	10

* Όπως προκύπτουν από καμπύλες επιβίωσης για διάστημα 15 ημερών (αναφορά 12). ** Με βάση το λόγο $AUC_{GI,VR}/AUC_{GI,GC}$ στις 48 ώρες

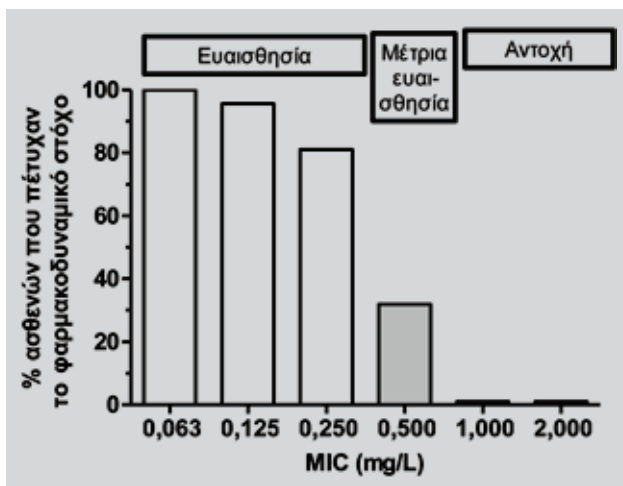


Εικόνα 4. *In vitro* (αριστερά) και *in vivo* (δεξιά, από αναφορά 22) συσχέτιση αντιμυκητιακής δράσης και της φαρμακοδυναμικής παραμέτρου fAUC/MIC για τα εξεταζόμενα στελέχη *A. fumigatus* με διαφορετικές *in vitro* ευαισθησίες. Η αντιμυκητιακή δράση για το *in vitro* μοντέλο υπολογίστηκε με βάση την περιοχή κάτω από την καμπύλη της γαλακτομαννάνης-χρόνου (1-% μυκητιακής ανάπτυξης $AUC_{GI,VRC}/AUC_{GI,GC}$), ενώ για τα *in vivo* πειράματα με βάση την επιβίωση (1-% θνητότητας). Το ήμισυ της μέγιστης αντιμυκητιακής δράσης στο *in vitro* φαρμακοκινητικό/φαρμακοδυναμικό μοντέλο παρουσιάστηκε στο $fAUC_{0-24}/MIC$ 11,53 (8–16), πολύ κοντά στο αντίστοιχο που βρέθηκε σε πειραματόζωα, 10,5 $fAUC_{0-24}/MIC$ με βάση τα ελεύθερα μόρια βορικοναζόλης (ποσοστό πρωτεϊνοσύνδεσης 58%).

θηκε σε πειραματόζωα, με βάση μόνο τα ελεύθερα μόρια βορικοναζόλης.¹²

Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης Monte Carlo φαίνονται στην εικόνα 5. Ο φαρμακοδυναμικός στόχος που βρέθηκε στο *in vitro* μοντέλο να σχετίζεται με τη μέγιστη αντιμυκητιακή δράση ήταν 56 fAUC/MIC. Ο στόχος αυτός επιτυγχάνεται σε μεγάλο ποσοστό ασθενών (>80%) με την

καθιερωμένη δοσολογία της βορικοναζόλης για στελέχη *A. fumigatus* με $MIC \leq 0,25$ mg/L, τα οποία θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ευαίσθητα. Το αντίστοιχο ποσοστό για στελέχη *A. fumigatus* με $MIC \geq 1$ mg/L είναι <5%, υποδηλώνοντας αντοχή στη βορικοναζόλη. Στελέχη με $MIC 0,5$ mg/L σχετίζονται με ενδιάμεσα ποσοστά επίτευξης φαρμακοδυναμικού στόχου (30%) και ενδεχομένως να παρουσιάζουν μέτρια ευαισθησία.



Εικόνα 5. Αποτελέσματα προσομοίωσης Monte Carlo. Τα ποσοστά επίτευξης φαρμακοδυναμικού στόχου σε 100 ασθενείς που προσομοιώθηκαν για στελέχη *A. fumigatus* με αυξανόμενες MIC. Στελέχη με $MIC \leq 0,25$ mg/L σχετίζονται με υψηλά % επίτευξης φαρμακοδυναμικού στόχου υποδηλώνοντας ευαισθησία, ενώ στελέχη με $MIC \geq 1$ mg/L σχετίζονται με χαμηλά % επίτευξης φαρμακοδυναμικού στόχου υποδηλώνοντας αντοχή.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε ένα νέο *in vitro* δυναμικό μοντέλο προσομοίωσης της φαρμακοκινητικής της βορικοναζόλης με βάση τα *in vivo* αποτελέσματα πειραματικής ασπεργίλλωσης και βρέθηκε πολύ καλή συσχέτιση τόσο των φαρμακοκινητικών όσο και των φαρμακοδυναμικών παραμέτρων. Το νέο αυτό μοντέλο χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τη μελέτη της δράσης της βορικοναζόλης έναντι στελεχών FAUC/MIC με αυξανόμενες MICs και βρέθηκε ότι η μέγιστη αντιμυκητιακή δράση αντιστοιχεί σε ένα AUC/MIC 56, δηλαδή τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα θα πρέπει να είναι τέτοια, έτσι ώστε η AUC_{0-24} να είναι 56 φορές το MIC. Δεδομένης της συσχέτισης μεταξύ AUC και των ελάχιστων επιπέδων φαρμάκου (trough levels), ο προσδιορισμός των οποίων είναι πιο πρακτικός στην κλινική πράξη, η μέγιστη αντιμυκητιακή δράση σχετίζεται με trough επίπεδα >2 mg/L. Όπως έδειξε και η Monte Carlo προσομοίωση, ο συγκεκριμένος στόχος επιτυγχάνεται σε

ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών (>80%) με τη χορήγηση της καθιερωμένης δοσολογίας των 4 mg/kg κάθε 12ωρο για στελέχη *A. fumigatus* με MIC $\leq 0,25$ mg/L και σε μικρότερο ποσοστό ασθενών (30%) για στελέχη με MIC 0,5 mg/L, ενώ για στελέχη με MIC ≥ 1 mg/L ο φαρμακοδυναμικός στόχος επιτυγχάνεται σε ένα πολύ μικρό ποσοστό ασθενών (<1%). Το γεγονός αυτό μας οδήγησε στο να προτείνουμε όρια ευαισθησίας για τη βορικοναζόλη $\leq 0,25$, 0,5, ≥ 1 mg/L για την ανίχνευση ευαίσθητων, μετρίως ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών, αντίστοιχα.

Παρά τις πρόσφατες κατευθυντήριες γραμμές εργαστηριακού ελέγχου ευαισθησίας νηματοειδών μυκήτων σε αντιμυκητιακά φάρμακα, επίσημα *in vitro* όρια ευαισθησίας για είδη *A. fumigatus* δεν έχουν ακόμη καθοριστεί λόγω των περιορισμένων κλινικών δεδομένων και της ελλιπούς συσχέτισης μεταξύ *in vitro* ευαισθησίας και κλινικής ανταπόκρισης στη θεραπεία.^{13,16} Ωστόσο, σε συμφωνία με τα προτεινόμενα όρια ευαισθησίας στην παρούσα μελέτη, η τιμή MIC 1 mg/L έχει προταθεί ως το επιδημιολογικό όριο (epidemiological cut-off value) για την ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών *A. fumigatus* στη βορικοναζόλη.^{11,17} Προς το παρόν, τα δεδομένα *in vivo* μελετών σχετικά με αζολο-ανθεκτικά στελέχη *A. fumigatus* είναι περιορισμένα. Συγκεκριμένα, η επιρροή σημειακών τροποποιήσεων στο γονίδιο-στόχο της δράσης των αζολών, *CYP51A*, στις φαρμακοδυναμικές ιδιότητες της βορικοναζόλης διερευνήθηκε σε μία μόνο μελέτη σε μη ουδετεροπενικό ζωικό μοντέλο διάχυτης ασπεργίλλωσης.¹² Σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε ότι η υψηλότερη τιμή MIC, στην οποία λοιμώξεις από είδη *A. fumigatus* θα μπορούσαν να θεραπευτούν με τη μέγιστη αποτελεσματικότητα, είναι 0,25 mg/L, όπως έδειξε και η Monte Carlo προσομοίωση στην παρούσα μελέτη.

Αν και το χρυσό κανόνα στην έρευνα θεραπευτικών προσεγγίσεων αποτελεί η εκπόνηση τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών, οι μελέτες αυτές συνήθως απαιτούν μεγάλο αριθμό ασθενών, συντονισμό πολλαπλών ιατρικών κέντρων και χαρακτηρίζονται από υψηλό κόστος και μεγάλη διάρκεια. Προκλινικές μελέτες σε ζωικά μοντέλα μπορεί να συνδράμουν στον έλεγχο της δραστηριότητας αντιμυκητιακών φαρμάκων για τη θεραπεία της διηθητικής ασπεργίλλωσης. Ωστόσο, η αξιοποίησή τους παρουσιάζει σημαντικούς περιορισμούς. Η εκδήλωση της πειραματικής ασπεργίλλωσης στα περισσότερα ζωικά μοντέλα είναι οξεία (υψηλά ποσοστά θνητότητας σε διάστημα 10 ημερών) σε αντίθεση με τη βραδύτερη εξέλιξη της νόσου που παρατηρείται σε ασθενείς, ενώ ο ακριβής προσδιορισμός του μυκητιακού φορτίου στους πνεύμονες είναι προβληματικός λόγω της δυσκολίας στην ποσοτικοποίηση των υφών του ασπέργιλλου με καλλιέργειες.¹⁸ Επί πλέον, η φαρμακοκινητική των αντιμυκητιακών φαρμάκων και ειδικά της βορι-

κοναζόλης στα ζωικά μοντέλα είναι διαφορετική από αυτή που παρατηρείται στον άνθρωπο, λόγω διαφορών στην απορρόφηση, στην κατανομή, στο μεταβολισμό και στην απέκκριση του φαρμάκου, ενώ διαφορές παρατηρούνται και στην εμφάνιση τοξικότητας.¹⁹ Τέλος, δεοντολογικά και ηθικά ζητήματα μπορεί να προκύψουν λόγω επίπονων πειραματικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται και του μεγάλου αριθμού πειραματοζώων που θυσιάζονται κατά τη διάρκεια των μελετών.²⁰

Πολλοί από τους περιορισμούς των *in vivo* μοντέλων μπορούν να υπερπηδηθούν με την ανάπτυξη *in vitro* φαρμακοκινητικών/φαρμακοδυναμικών μοντέλων. Τα *in vitro* μοντέλα μπορούν να προσομοιώσουν με ακρίβεια τη φαρμακοκινητική των φαρμάκων στον άνθρωπο, να εφαρμοστούν για τον καθορισμό της αντιμυκητιακής δράσης διαφόρων σχημάτων χορήγησης έναντι των παθογόνων-στόχων και τον προσδιορισμό της φαρμακοκινητικής/φαρμακοδυναμικής παραμέτρου που σχετίζεται με το βέλτιστο αποτέλεσμα.²¹ Συγκρινόμενα με τα ζωικά μοντέλα παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως μεγαλύτερη ευελιξία και προσαρμοστικότητα σε διάφορες συνθήκες, χαμηλότερο κόστος, δυνατότητα μελέτης συνδυασμού παραγόντων έναντι ποικιλίας μυκητιακών παθογόνων σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων, εξετάζοντας διαφορετικές παραμέτρους (δραστηριότητα, τοξικότητα κ.λπ.), δυνατότητα παρακολούθησης της μυκητιακής ανάπτυξης σε βάθος χρόνου, καλύτερη προσομοίωση της φαρμακοκινητικής του ανθρώπου, δυνατότητα διεξαγωγής μελετών σχετικά με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας κλινικών στελεχών στα αντιμυκητιακά, με επακόλουθο τον καθορισμό αντιπροσωπευτικότερων *in vitro* ορίων ευαισθησίας.

Ωστόσο, μικρός αριθμός τέτοιου είδους μοντέλων έχει περιγραφεί στη διερεύνηση της φαρμακοδυναμικής αντιμυκητιακών παραγόντων, κυρίως έναντι ειδών του γένους *Candida*.^{22,23} Για είδη *Aspergillus*, εκτός από το μοντέλο που αναπτύχθηκε από την εργαστηριακή μας ομάδα και προσομοιώνει τη φαρμακοκινητική αντιμυκητιακών φαρμάκων στο ανθρώπινο αίμα,¹⁴ μόνο ένα μοντέλο που προσομοιώνει τις ανθρώπινες κυψελίδες του πνεύμονα αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία, το οποίο όμως είναι αρκετά περίπλοκο προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή πράξη, ενώ κατά το συσχετισμό *in vitro-in vivo* αποτελεσμάτων βρέθηκαν σημαντικές ασυμφωνίες.²⁴

Η διενέργεια φαρμακοκινητικών/φαρμακοδυναμικών μελετών έχει ως απώτερο στόχο τη συσχέτιση μεταξύ των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων του εξεταζόμενου φαρμάκου, της *in vitro* δραστηριότητάς του και της αποτελεσματικότητας της θεραπείας.²⁵ Σε αρκετές περιπτώσεις, οι σχέσεις οι οποίες ορίζονται από τα πειραματικά συστήματα που περιλαμβάνουν έχουν αποδειχθεί προβλεπτικές του θεραπευτικού

αποτελέσματος στον άνθρωπο.²⁶ Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτές αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα του σχεδιασμού του βέλτιστου δοσολογικού σχήματος, της πρόληψης της τοξικότητας, της επικύρωσης και της ερμηνείας *in vitro* ορίων ευαισθησίας, καθώς και του προσδιορισμού της ανθεκτικότητας σε κάποιο φάρμακο. Τα τελευταία χρόνια, οι εν λόγω μελέτες χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο στην έρευνα για τη θεραπευτική αντιμετώπιση απειλητικών για τη ζωή πνευμονικών νοσημάτων που οφείλονται σε παθογόνους μύκητες, όπως τα είδη του γένους *Aspergillus*. Ο ορθός σχεδιασμός και η υλοποίησή τους διευκολύνει την τελέσφορη αξιοποίηση των διαθέσιμων αντιμυκητιακών παραγόντων.^{27,28}

Το *in vitro* μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη επιτρέπει την έκθεση του μύκητα σε μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις φαρμάκου και προσομοιώνει τη φαρμακοκινητική της βορικοναζόλης στον άνθρωπο και στα ζώα. Επιτρέπει την παρακολούθηση της αντιμυκητιακής δράσης σε βάθος χρόνου με έναν ποσοτικό δείκτη της μυκητιακής ανάπτυξης και τον προσδιορισμό της φαρμακοκινητικής/φαρμακοδυναμικής παραμέτρου που αντιστοιχεί στη μέγιστη αντιμυκητιακή δράση. Επίσης, τα αποτελέσματα του *in vitro* μοντέλου συσχετίζονται με *in vivo* αποτελέσματα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στη μείωση-αντικατάσταση πειραμάτων με ζωικά μοντέλα. Ο συνδυασμός *in vitro* αποτελεσμάτων με φαρμακοκινητικά δεδομένα προηγούμενων κλινικών μελετών με Monte Carlo

προσομοίωση μπορεί να οδηγήσει στον προσδιορισμό κλινικών ορίων ευαισθησίας. Βασική προϋπόθεση για τέτοιου είδους αναλύσεις είναι να ληφθεί υπ' όψη το ποσοστό πρωτεϊνοσύνδεσης του φαρμάκου, μιας και το ελεύθερο φάρμακο είναι αυτό που διανέμεται στους ιστούς και είναι υπεύθυνο για τη φαρμακολογική δράση. Ανάμεσα στους περιορισμούς του *in vitro* μοντέλου είναι ότι η δυναμική αντιμυκητιακή επίδραση των ανοσοδραστικών κυττάρων και η τοξικότητα των χορηγούμενων δόσεων δεν μπορεί να εκτιμηθεί.

Η διερεύνηση του φαινομένου της αντοχής σε αντιμυκητιακούς παράγοντες είναι σημαντική προκειμένου να αναπτυχθούν αποτελεσματικότερες προφυλακτικές και θεραπευτικές στρατηγικές, με σκοπό να ελαχιστοποιηθούν οι δυσκολίες που αναδύονται από τα συνεχώς αυξανόμενα ποσοστά εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών. Επίσης, η μελέτη υποθεραπευτικών επιπέδων των αντιμυκητιακών φαρμάκων μπορεί να οδηγήσει στη βελτιστοποίηση της θεραπείας. Προς αυτή την κατεύθυνση μπορούν να χρησιμοποιηθούν *in vitro* μοντέλα φαρμακοκινητικής προσομοίωσης και φαρμακοδυναμικής ανάλυσης αξιολογημένα με *in vivo* πειράματα, όπως το παρόν μοντέλο. Τα προτεινόμενα όρια ευαισθησίας στη βορικοναζόλη για στελέχη *A. fumigatus* ενδεχομένως να συνδράμουν το μικροβιολογικό εργαστήριο στην ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών και τον κλινικό ιατρό στη χορήγηση αποτελεσματικότερης θεραπείας.

ABSTRACT

Determination of the sensitivity limits to voriconazole of *Aspergillus fumigatus* in an *in vitro* pharmacokinetic-pharmacodynamic simulation model

M. SIOPI, A. ELEFANTI, R. AL-SAIGH, N. SIAFAKAS, L. ZERVA, I. MELETIADIS

Laboratory of Clinical Microbiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, "Attikon" University General Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2013, 30(1):35–45

OBJECTIVE Although strains of *Aspergillus fumigatus* with reduced *in vitro* susceptibility to voriconazole have been described, clinical breakpoints have not yet been defined. The aim of this study was to correlate the results of the new *in vitro* pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model with previous results from animal models and to investigate the efficacy of voriconazole against *A. fumigatus* isolates, determining susceptibility breakpoints. **METHOD** Four clinical *A. fumigatus* isolates were studied: one wild-type control with MIC 0.25 mg/L and three strains with defined *CYP51A* mutations with MICs 0.125, 0.25 and 2 mg/L, previously tested in animal models. The *in vivo* voriconazole dosages of 10, 40 and 80 mg/kg that were used in animal model were simulated in the *in vitro* PK-PD model with maximum concentrations of 1.60, 11.09 και 36.49 mg/L, respectively and an average half-life of 6 hours. The area under the drug concentration-time curve AUC (PK parameter) and the area under the galactomannan concentration-time curve AUC_{G_M} (PD parameter) were determined for each dose and isolate. The *in vitro* relationship of % antifungal activity-AUC/MIC was correlated with the *in vivo* survival-AUC/MIC. Monte Carlo simulation analysis was performed for 100 patients receiving standard voriconazole dosage of 4 mg/kg qd and the % of patients attaining the pharmacodynamic target

FAUC/MIC associated with near maximal antifungal activity was calculated for *A. fumigatus* isolates with different MICs. **RESULTS** The *in vitro* pharmacokinetic parameters and % of antifungal efficacy were similar to those previously observed in animal models (paired t test $p=0.4$). The *in vitro* % fungal growth-AUC/MIC followed a sigmoid curve similar to that derived from the animal model ($R^2=0.91$). The PK/PD parameter $FAUC_{0-24}/MIC$ corresponding to 50% of maximal antifungal efficacy was 11.53 (range 8–16) in the *in vitro* model, close to the *in vivo* $FAUC_{0-24}/MIC$ of 10.5 observed in animals. Monte Carlo simulation analysis showed that the pharmacodynamic target of 56 $FAUC_{0-24}/MIC$ associated with maximal antifungal efficacy was attained in >80% of patients receiving standard voriconazole dosing for isolates with $MIC \leq 0.25$, which can be considered as susceptible, whereas the % of target attainment for isolates with $MIC \geq 1$ was <5%, indicating resistance. **CONCLUSIONS** The results of the new *in vitro* PK-PD model were comparable with those derived from animal models. Study of voriconazole activity in the new *in vitro* PK-PD model indicates susceptibility breakpoints of ≤ 0.25 , 0.5, ≥ 1 which could be used to detect susceptible, intermediately susceptible and resistant *A. fumigatus* isolates, respectively.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, Monte Carlo simulation, Resistance, Susceptibility breakpoints, Voriconazole

Βιβλιογραφία

- SHERIF R, SEGAL BH. Pulmonary aspergillosis: Clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Curr Opin Pulm Med* 2010, 16:242–250
- WALSH TJ, ANAÏSSIE EJ, DENNING DW, HERBRECHT R, KONTOYIANNIS DP, MARR KA ET AL. Treatment of aspergillosis: Clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008, 46:327–360
- HERBRECHT R, DENNING DW, PATTERSON TF, BENNETT JE, GREENE RE, OESTMANN JW ET AL. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002, 347:408–415
- KONTOYIANNIS DP. Invasive mycoses: Strategies for effective management. *Am J Med* 2012, 125(Suppl 1):S25–S38
- ROGERS TR, SLAVIN MA, DONNELLY JP. Antifungal prophylaxis during treatment for haematological malignancies: Are we there yet? *Br J Haematol* 2011, 153:681–697
- SNELDERS E, MELCHERS WJ, VERWEIJ PE. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: A new challenge in the management of invasive aspergillosis? *Future Microbiol* 2011, 6:335–347
- VERWEIJ PE, MELLADO E, MELCHERS WJ. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med* 2007, 356:1481–1483
- HOWARD SJ, ARENDROP MC. Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: Epidemiology and detection. *Med Mycol* 2011, 49(Suppl 1):S90–S95
- SNELDERS E, HUIS IN'T VELD RA, RIJS AJ, KEMA GH, MELCHERS WJ, VERWEIJ PE. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol* 2009, 75:4053–4057
- VERWEIJ PE, SNELDERS E, KEMA GH, MELLADO E, MELCHERS WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: A side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis* 2009, 9:789–795
- VERWEIJ PE, HOWARD SJ, MELCHERS WJ, DENNING DW. Azole-resistance in *Aspergillus*: Proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resist Updat* 2009, 12:141–147
- MAVRIDOU E, BRUGGEMANN RJ, MELCHERS WJ, VERWEIJ PE, MOUTON JW. Impact of cyp51A mutations on the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of voriconazole in a murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54:4758–4764
- CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. 2nd ed. M38-A2. 2008, 28:1–35
- MELETIADIS J, AL-SAIGH R, VELEGRAKI A, WALSH TJ, ROILIDES E, ZERVA L. Pharmacodynamic effects of simulated standard doses of antifungal drugs against *Aspergillus* species in a new *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56:403–410
- PURKINS L, WOOD N, GHAHRAMANI P, GREENHALGH K, ALLEN MJ, KLEINERMANS D. Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous- to oral-dose escalation regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46:2546–2553
- LASS-FLÖRL C, PERKHOFER S, MAYR A. *In vitro* susceptibility testing in fungi: A global perspective on a variety of methods. *Mycoses* 2010, 53:1–11
- RODRIGUEZ-TUDELA JL, ALCAZAR-FUOLI L, MELLADO E, ALASTRUÉY-IZQUIERDO A, MONZON A, CUENCA-ESTRELLA M. Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, 52:2468–2472
- CAPILLA J, CLEMONS KV, STEVENS DA. Animal models: An important tool in mycology. *Med Mycol* 2007, 45:657–684
- ROFFEY SJ, COLE S, COMBY P, GIBSON D, JEZEQUEL SG, NEDDERMAN AN ET AL. The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. *Drug Metab Dispos* 2003, 31:731–741
- CLEMONS KV, STEVENS DA. Animal models testing monotherapy versus combination antifungal therapy: Lessons learned and future directions. *Curr Opin Infect Dis* 2006, 19:360–364
- GLOEDE J, SCHEERANS C, DERENDORF H, KLOFT C. *In vitro* pharmacodynamic models to determine the effect of antibacterial drugs. *J Antimicrob Chemother* 2010, 65:186–201
- LIGNELL A, JOHANSSON A, LÖWDIN E, CARL O, SJÖLIN J. A new *in vitro* kinetic model to study the pharmacodynamics of antifun-

- gal agents: Inhibition of the fungicidal activity of amphotericin B against *Candida albicans* by voriconazole. *Clin Microbiol Infect* 2007, 13:613–619
23. LEWIS RE, LUND BC, KLEPSE ME, ERNST EJ, PFALLER MA. Assessment of antifungal activities of fluconazole and amphotericin B administered alone and in combination against *Candida albicans* by using a dynamic *in vitro* mycotic infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 1998, 42:1382–1386
24. HOPE WW, KRHLAK MJ, LYMAN CA, PETRAITIENE R, PETRAITIS V, FRANCESCONI A ET AL. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an *in vitro* model of early invasive pulmonary aspergillosis: Implications for antifungal therapy. *J Infect Dis* 2007, 195:455–466
25. ANDES D. Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics: Understanding the implications for antifungal drug resistance. *Drug Resist Updat* 2004, 7:185–194
26. AMBROSE PG, BHAVNANI SM, RUBINO CM, LOUIE A, GUMBOT, FORREST A ET AL. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: It's not just for mice anymore. *Clin Infect Dis* 2007, 44:79–86
27. LEPAK AJ, ANDES DR. Antifungal PK/PD considerations in fungal pulmonary infections. *Semin Respir Crit Care Med* 2011, 32:783–794
28. ANDES D. Clinical utility of antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Curr Opin Infect Dis* 2004, 17:533–540

Corresponding author:

J. Meletiadis, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Clinical Microbiology Laboratory, "Attikon" General Hospital, 1 Rimini street, GR-124 62 Haidari, Greece, e-mail: jmeletiadis@med.uoa.gr

.....