

Терапевтический лекарственный мониторинг в больнице им. И. В. Давыдовского: опыт использования метода ВЭЖХ–МС/МС в практическом здравоохранении

Т. А. Родина, к.х.н., химик-эксперт лаборатории фармакокинетики

Е. С. Мельников, к.ф.н., химик-эксперт лаборатории фармакокинетики

ГБУЗ «Городская клиническая больница имени И. В. Давыдовского» Департамента здравоохранения г. Москвы

Therapeutic drug monitoring in Davydovsky Hospital: using HPLC–MS/MS method in practical healthcare

T. A. Rodina, E. S. Melnikov

Municipal Clinical Hospital n.a. I. V. Davydovsky, Moscow, Russia

Резюме

Показана важность проведения терапевтического лекарственного мониторинга с использованием тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии в случае не только лекарственных средств с узким диапазоном терапевтических концентраций, но и в случае использования более «простых» препаратов, таких как антигипертензивные лекарственные средства и антикоагулянты. Приведены примеры выбора индивидуальной схемы терапии и корректировки дозы лекарственного средства с целью устранения побочных эффектов. Рассмотрены случаи решения нестандартных ситуаций, возникающих при проведении биоаналитических исследований.

Ключевые слова: терапевтический лекарственный мониторинг, масс-спектрометрия, фармакокинетика, биоаналитика.

Summary

There was shown that therapeutic drug monitoring by liquid tandem mass spectrometry is essential not only for the drugs with a narrow therapeutic window but also for "simple" medicines like anti-hypertension and anticoagulant drugs. The examples of choosing an individual therapy and adjusting the drug dosage to eliminate side effects were given. The cases of solving non-standard situations that arise during bioanalytical studies were considered.

Key words: therapeutic drug monitoring, mass spectrometry, pharmacokinetic, bioanalysis.

Мало кто осознает, сколько труда и времени тратится на создание нового лекарственного препарата (ЛП), сколько средств вложено в маленькую таблетку или ампулу, спасающую людям жизнь. А сколько, казалось бы, перспективных начинаний было выброшено на помойку из-за открывшихся, например, на стадии доклинических или клинических испытаний побочных реакций (нежелательных лекарственных реакций, НЛР). В среднем на создание одного лекарственного средства (ЛС) тратится 10–15 лет. Выбирают одну-единственную структуру порой из сотен тысяч близких по химической природе. Стоимость таких исследований может измеряться сотнями миллионов долларов.

Появление любого нового лекарственного средства всегда встречается с радостью и оптимизмом. Однако чем дольше ЛС используется в клинической практике, тем больше появляется информации о его эффективности и безопасности, суммируются данные о межлекарственных взаимодействиях. Результаты, достигнутые в области изучения метаболизма ЛС (в первую очередь цитохрома P450), фармакогенетики, свидетельствуют о том, что многие ЛС невозможно назначать по шаблону, а необходимо учитывать индивидуальные особенности каждого пациента (рис. 1).

Мощным инструментом персонализированной медицины является терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ), суть которого состоит в определении концентрации лекарственного вещества (ЛВ) и (или) его метаболитов в крови (реже в моче) и в корректировке дозы и кратности приема препарата на основании полученных данных.

Для внедрения такого подхода в практику в 2013 году в Центре персонализированной медицины (ЦПМ) ГКБ им. И. В. Давыдовского (г. Москва) была создана лаборатория фармакокинетики, которую оснастили ВЭЖХ-системой Nexera с МС/МС-детектором LCMS-8040 (Shimadzu, Япония).

За прошедшие годы нами были разработаны и внедрены в практику методики [1–6] определения ЛВ из разных фармакологических групп, а именно: антикоагулянты, антиконвульсанты, гипотензивные, гипогликемические, противоопухолевые ЛС. Краткое описание некоторых методик представлено в табл. 1.

Считается, что ТЛМ необходим прежде всего для ЛС с узким диапазоном терапевтических концентраций, например для карбамазепина. Однако наша практика показала, что ТЛМ может быть полезен и для более простых ЛС. Например, эналаприл, широко известное и давно используемое во врачебной практике ЛС, редко

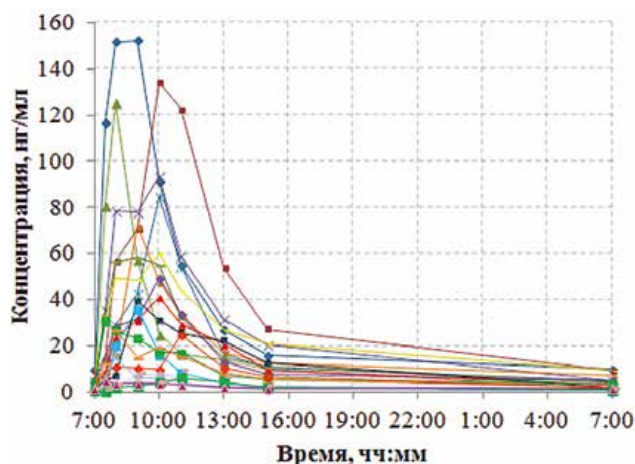


Рисунок 1. Индивидуальные фармакокинетические кривые при суточном мониторингировании ЛВ в сыворотке крови пациентов, принимавших один и тот же противоопухолевый препарат в одинаковой дозе, в одно и то же время. Видно, насколько значимы различия фармакокинетики у людей в одной популяции, а следовательно, столь же ощутимой может быть разница в ответе организма на терапию.

применяется в виде монотерапии. Как правило, пациенты принимают несколько гипотензивных препаратов, причем в большинстве случаев требуется назначение ЛС из других групп для лечения сопутствующих патологий. В такой ситуации по клиническим проявлениям трудно понять, связаны ли побочные эффекты или неэффективность лечения именно с изучаемым ЛС, либо состояние пациента обусловлено иными факторами.

Эналаприл является пролекарством и сам по себе оказывает слабое антигипертензивное действие. Активный

метаболит эналаприла эналаприлат образуется в организме при гидролизе под действием карбоксилэстеразы. В связи с этим выраженность и длительность гипотензивного действия при приеме эналаприла во многом определяется скоростью его гидролиза до эналаприлата, которая может значительно различаться у пациентов. Опасность при применении эналаприла представляют гипотония и ее осложнения. При правильно подобранном режиме дозирования концентрация эналаприлата в плазме крови должна оставаться в рамках терапевтического диапазона (10–50 нг/мл), а клинический эффект сохраняется до 24 часов после приема препарата. Однако в целом ряде случаев при его назначении трудно добиться стабильного снижения артериального давления (АД) до необходимого уровня. Это связано, по нашему мнению, с тем, что при назначении ЛС не учитывается фенотип пациента по скорости гидролиза эналаприла, определить который можно, рассчитав отношение концентрации эналаприла к концентрации эналаприлата в сыворотке крови человека. Данный подход является прямым методом оценки метаболической активности. Параллельно контролируется абсолютное значение концентрации ЛВ в сравнении со средними (нормальными) значениями. Полученная в ходе проведения ТЛМ информация помогает принять решение о коррекции дозы, кратности приема, отмене или замене препарата, если это необходимо.

Алгоритм выбора индивидуальной схемы терапии эналаприлом проиллюстрирован следующим примером (табл. 2). В стационар поступил пациент Г., которому

Таблица 1
Некоторые методики, разработанные в лаборатории фармакокинетики ЦПМ ГКБ им. И. В. Давыдовского

№	Аналит	Объект	Метод пробоподготовки	Аналитический диапазон, нг/мл	Колонка	Элюент	Режим ионизации и детектирования	Ссылка
1.	Эналаприл Эналаприлат	Сыворотка	Осаждение белков 50% ТФУ	5–250	Phenomenex Synergi Polar-RP 50 × 4,6 мм, 4 мкм	A: 1% FA / вода B: 1% FA / AcN Градиентный режим	ESI+, MRM	1
2.	Метопролол Нифедипин		Осаждение белков AcN	5–250				2, 3
	Дегидронифедипин Бисопролол			1–250				
	Карbamазепин			50–20000	Waters XBridge C18 50 × 4,6 мм, 3,5 мкм	A: 0,1% FA / вода B: 0,1% FA / cap	ESI-, MRM	4
3.	Карbamазепин-10,11-эпоксид			5–2000				
4.	Дабигатран Ривароксабан Апиксабан	Сыворотка, моча	Осаждение белков MeOH и разбавление водой	1–1000	Phenomenex Luna C18 (2) 50 × 4,6 мм, 5 мкм		ESI+, MRM	5, 6
	Варфарин			10–2000				
5.	Лозартан Лозартан-карбоксилат Глибенкламид	Сыворотка	Осаждение белков AcN	5–1000				*
6.	Новый противоопухолевый препарат			0,5–200				**

Примечание: ESI+ — положительная ионизация в режиме электрораспыления, ESI- — отрицательная ионизация в режиме электрораспыления, MRM (multiple reaction monitoring) — мониторинг множественных реакций, AcN — ацетонитрил, MeOH — метанол, FA (Formic Acid) — муравьиная кислота; * — статья находится в печати, ** — исследование в настоящее время продолжается.

Таблица 2
Подбор терапевтической дозы эналаприла пациенту Г.

День	Доза	Проба № 1 (до приема)		Проба № 2 (через 4 часа после приема)	
		Эналаприл, нг/мл	Эналаприлат, нг/мл	Эналаприл, нг/мл	Эналаприлат, нг/мл
1-й	10 мг 2 раза в день	Ниже НПКО*	44,32	5,25	131,09
4-й	7,5 мг 2 раза в день	Ниже НПКО	38,75	Ниже НПКО	72,68
8-й	5 мг 2 раза в день	Ниже НПКО	33,55	Ниже НПКО	34,65

Примечание:* — НПКО — нижний предел количественного определения.

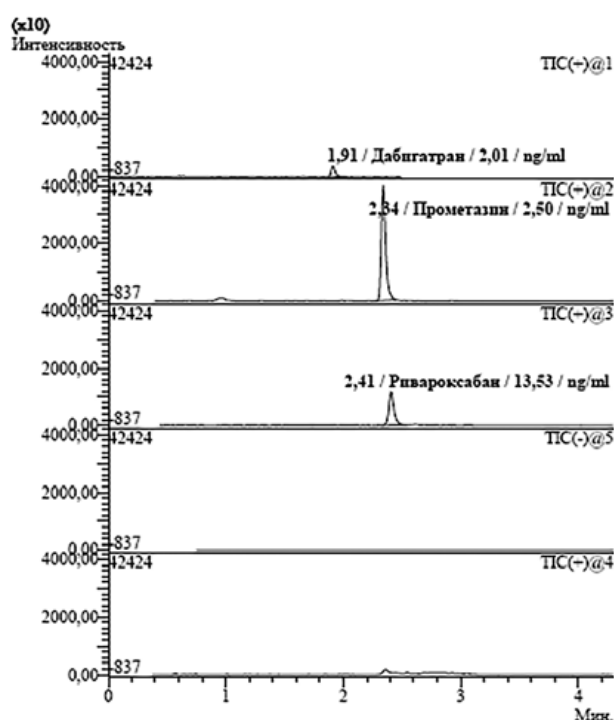


Рисунок 2. Хроматограмма образца сыворотки крови пациента Н. с низкой приверженностью к лечению антикоагулянтами, на хроматограмме присутствует только пик соответствующий внутреннему стандарту.

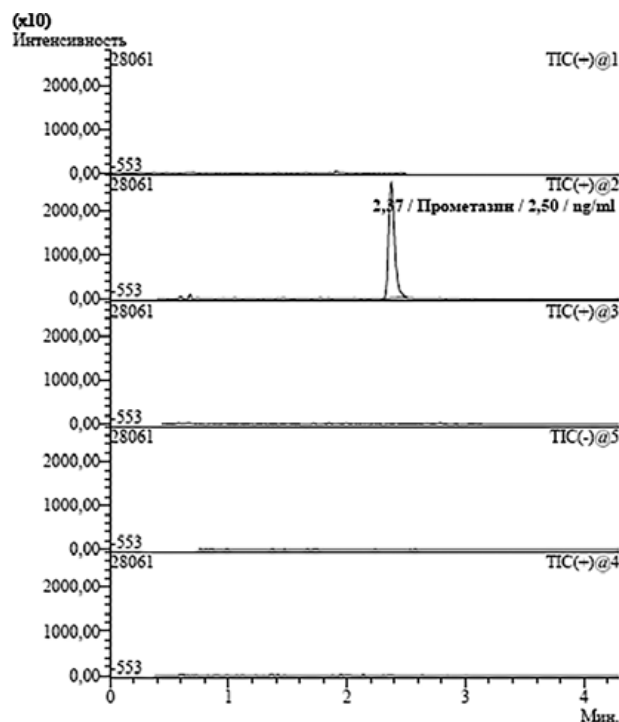


Рисунок 3. Хроматограмма образца сыворотки крови пациента Л. которому производилась замена дабигатрана на ривароксабан (до приема препарата).

ранее был назначен прием эналаприла дважды в день по 10 мг. Данная схема позволяла добиться желаемого терапевтического эффекта, однако при проведении ТЛМ было выявлено повышенное значение концентрации активного метаболита в крови. В последующие дни доза препарата дважды снижалась, и всякий раз мы проводили определение концентрации эналаприла и его метаболита. В конечном счете доза была снижена в два раза, терапевтический эффект остался на прежнем уровне, а значения концентраций стали соответствовать нормальным значениям, соответственно значительно уменьшился риск гипотонии.

Особенно трудно на практике проконтролировать, сколько добросовестно пациент выполняет предписание врача. Часто неэффективность лечения связана не с низким качеством препарата или особенностями метаболизма ЛС, а является следствием низкой приверженности больного лечению, что является огромной общемировой проблемой [7]. Даже в условиях стационара можно столкнуться с таким явлением, а ежеминутно следить за каждым

больным, принял ли он препарат, невозможно. Эффективно и эффективно бороться с этой проблемой помогает ТЛМ. Обычно пациента невозможно уличить в подобной халатности по отношению к собственному здоровью, но хроматограмма, на которой отсутствует пик ЛВ, хотя пациент должен был его принимать, является неоспоримым доказательством и дает врачу возможность своевременно принять необходимые меры.

Наши наблюдения при проведении ТЛМ пациентов, госпитализированных по поводу ишемического инсульта, которым при этом ранее была назначена антикоагуляционная терапия, показывают, что в порядка 40 % случаев причиной развития острого состояния являлась именно низкая приверженность лечению. В пробах сыворотки крови данной категории пациентов новые оральные антикоагулянты (НОАК) и варфарин либо не были обнаружены вовсе (рис. 2), либо значение концентрации едва превышало НПКО методики.

В других случаях, составляющих порядка 6 % проведенных исследований, были определены концентрации

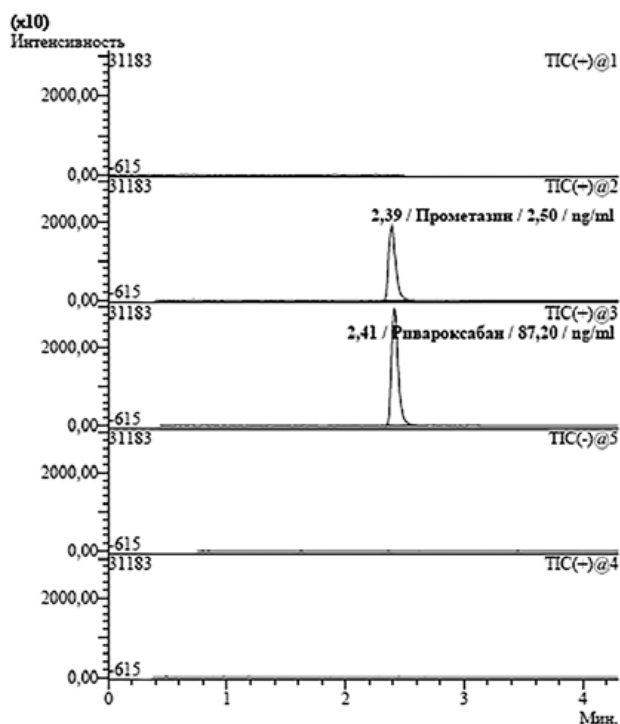


Рисунок 4. Хроматограмма образца сыворотки крови пациента Л, которому производилась замена дабигатрана на ривароксабан (через 4 часа после приема ривароксабана).

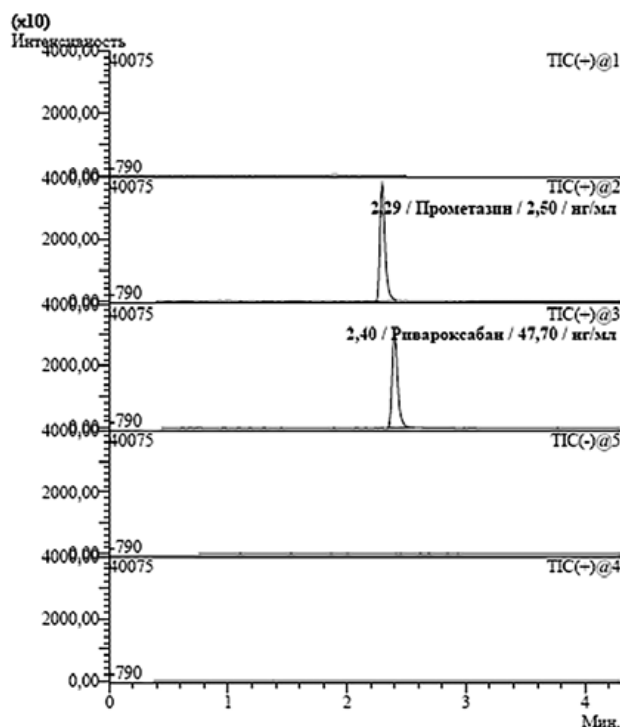


Рисунок 5. Хроматограмма образца сыворотки крови пациентки Ж. в первый день исследования на фоне кровотечения.

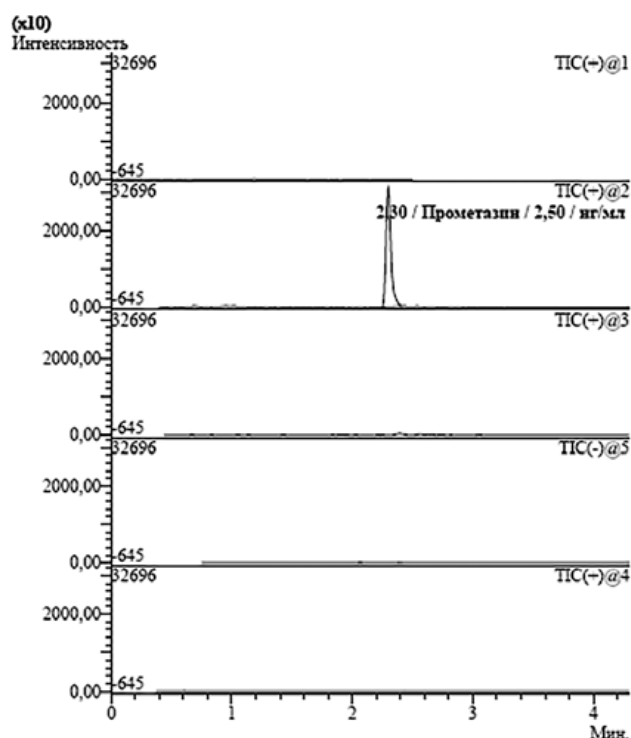


Рисунок 6. Хроматограмма образца сыворотки крови пациентки Ж. после изменения схемы лечения, проба до приема препарата.

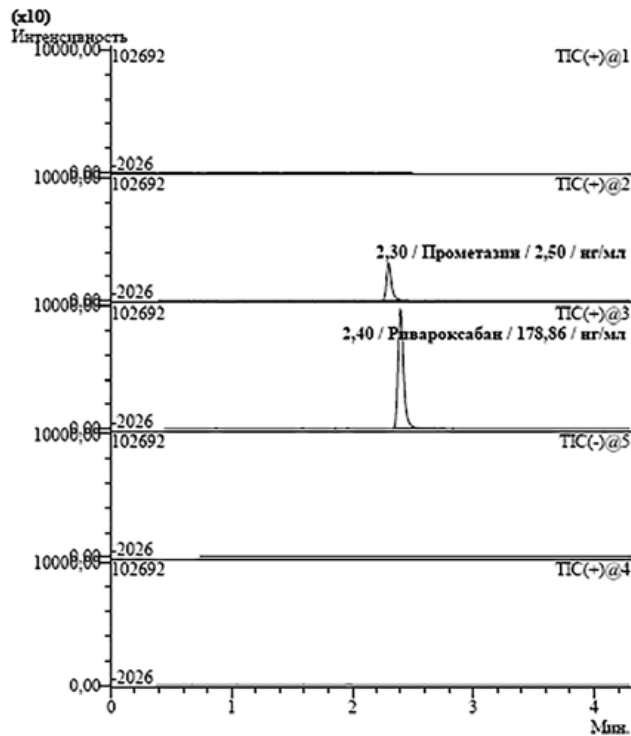


Рисунок 7. Хроматограмма образца сыворотки крови пациентки Ж. после изменения схемы лечения, проба через 4 часа после приема препарата.

НОАК, существенно превышающие средние максимальные значения. В данной группе пациентов проводилась коррекция дозы препарата для своевременно предотвращения НЛР.

Важной задачей ТЛМ является контроль в ситуации вынужденной замены одного антикоагулянта другим,

например при выявлении хронической болезни почек у пациента Л. (рис. 3, 4).

Наиболее часто встречаются случаи замены варфарина на более безопасные НОАК. Стоит отметить, что снижение концентрации варфарина при подобном переключении происходит очень медленно ($T_{1/2}$ варфа-

рина составляет около 40 часов), поэтому требуется тщательный подбор дозы и времени приема НОАК, поскольку ввиду синергизма велика вероятность развития НЛР. Количество пациентов, которым проводится замена антикоагулянта, составило приблизительно 10% от общего количества всех, которым проводился ТЛМ антикоагулянтов.

Интересен случай пациентки Ж., которая принимала ривароксабан 15 мг дважды в день по причине двусторонней тромбоэмболии легочной артерии. На фоне приема препарата и менструации развилось маточное кровотечение. Первый отбор крови был сделан через 19 часов после последнего приема препарата, и наблюдалась концентрация ривароксабана 47,7 нг/мл, что следует считать повышенным значением с учетом прошедшего с последнего приема времени.

Через 2 дня фармакокинетическое исследование было проведено повторно. Пациентке скорректировали дозировку, она стала принимать 20 мг раз в день. В период между первым отбором (на фоне кровотечения) и последующими отборами, проведенными через 2 дня, пациентка не принимала ривароксабан. В точке отбора до приема 20 мг ривароксабана наблюдаются лишь следы ривароксабана (рис. 6), тогда как в пробе сыворотки крови, отобранной через 4 часа после приема препарата определено 178,9 нг/мл ривароксабана, что можно расценивать как нормальный уровень концентрации (рис. 7). Повторных эпизодов маточного кровотечения после коррекции дозы не отмечалось.

Как видно из приведенных примеров, метод ВЭЖХ-МС/МС при проведении ТЛМ способен дать врачу ответы на многие вопросы и внести ясность в сложных случаях, возникающих при назначении широкого круга ЛС. Однако, несмотря на уникальные технические характеристики масс-анализаторов с тройным квадруполем, качество и достоверность результатов очень сильно зависят от уровня знаний и опыта химика-аналитика в области хроматографии и масс-спектрометрии. Следующий пример демонстрирует, какие неожиданные и нестандартные ситуации могут возникать при проведении биоаналитических исследований.

При рутинном анализе проб сыворотки пациентов, принимавших нифедипин, было сделано любопытное наблюдение: в одних случаях хроматограмма для нифедипина имела такой же вид, как у калибровочных образцов (рис. 8 А) и образцов контроля качества (quality control, QC), но в других случаях на хроматограмме наблюдалось два пика (рис. 8 В). Один из них соответствовал по времени удерживания нифедипину, а второй относился к неизвестному веществу, которое удерживалось слабее нифедипина, но при этом пики были хорошо разделены хроматографически.

Для объяснения мы выдвинули две гипотезы. Во-первых, наличие двух пиков могло быть связано с какими-либо проблемами хроматографического разделения, например усталость или загрязнение сорбента и (или) старая предколонка, в этом случае оба пика могут соответствовать нифедипину, который элюировался в виде

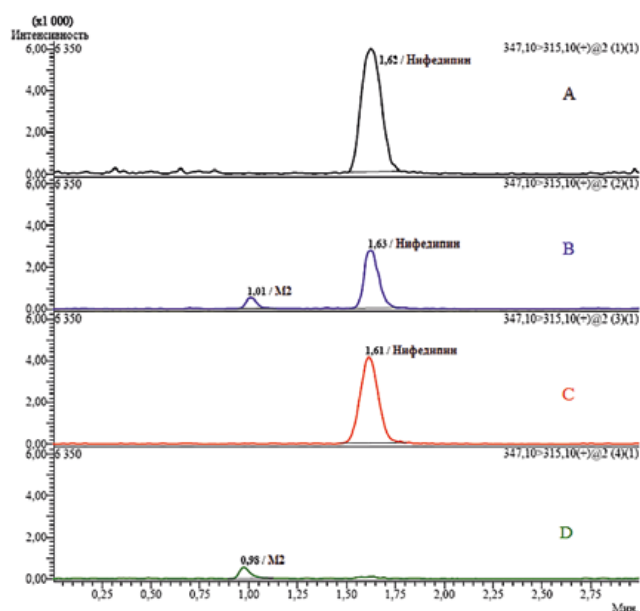


Рисунок 8. А — хроматограмма калибровочного образца (интактная сыворотка крови и стандартный раствор нифедипина); В — хроматограмма образца сыворотки крови пациента, пробоподготовка осаждением белков ацетонитрилом; С — хроматограмма того же образца сыворотки крови пациента, пробоподготовка методом экстракции этилацетатом при pH около 9; D — хроматограмма того же образца сыворотки крови пациента, пробоподготовка методом экстракции этилацетатом при pH около 5 (повторная экстракция после извлечения нифедипина этилацетатом при pH около 9).

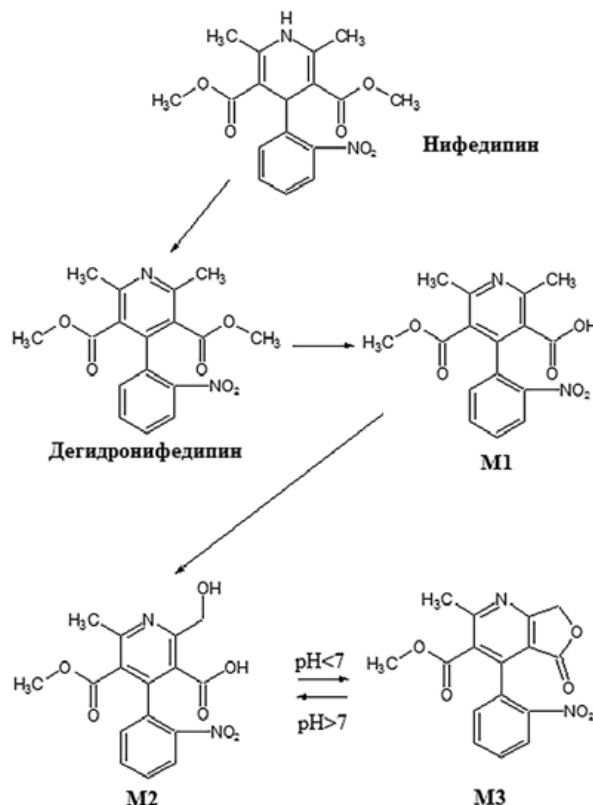


Рисунок 9. Схема метаболизма нифедипина.

двух зон. Во-вторых, возможна интерференция с каким-то другим веществом в составе образца. При этом следует учитывать, что масс-спектрометрический детектор работал в режиме MRM^+ (регистрировался переход

347,1→315,1), то есть использовался высокоселективный режим работы, и риск интерференции с каким-либо посторонним соединением нам казался крайне низким, так как для этого неизвестное вещество должно иметь не только такую же молекулярную массу (М. м.), что и аналит, но и максимально близкую структуру, чтобы иметь аналогичный путь фрагментации.

Первая гипотеза была отвергнута по следующим причинам: во-первых, два пика присутствовали лишь на части хроматограмм проб пациентов, тогда как для других образцов, проанализированных в рамках того же аналитического цикла, второй («неизвестный») пик отсутствовал, причем его никогда не было на хроматограммах калибровочных и QC-образцов; во-вторых, оставались постоянными время удерживания и асимметрия основного пика, хотя их изменения следует ожидать в случаях ухудшения условий хроматографического разделения.

В связи с вышесказанным вторая гипотеза о наличии в образцах неуставленного компонента со сходной структурой и соответствующей нифедипину молекулярной массой была принята за основную.

При внимательном изучении информации [8] о биотрансформации нифедипина было обнаружено, что у него существует метаболит M2 (рис. 9), М. м. которого (346,29) практически точно соответствует М. м. нифедипина (346,33). MRM-переход, использованный для детектирования нифедипина (347,1→315,1), обусловлен отщеплением CH_3OH от $[\text{M}+\text{H}]^+$. Структура метаболита также дает возможность для такой реакции при фрагментации.

Обосновать предположение о том, что второй пик на хроматограммах нифедипина относится к метаболиту, помогла серия экспериментов. Поскольку закупка стандартного образца предполагаемого метаболита для прямого доказательства нашей гипотезы была бы затратной и длительной по времени, а интерпретация результатов требовалась довольно быстро, для подтверждения либо опровержения нашей второй гипотезы были проведены дополнительные мероприятия.

Нифедипин не обладает выраженными кислотными или основными свойствами, причем даже нет достоверной непротиворечивой информации о его рКа. Метаболит M2, напротив, содержит карбоксильную группу, придающую кислотные свойства, а также слабоосновный пиридиновый атом азота. Таким образом, химические свойства нифедипина и M2 радикально отличаются, и эти вещества можно разделить на этапе пробоподготовки образца сыворотки методом жидкость-жидкостной экстракции. Действительно, при основных значениях pH в органическую фазу извлекался только сам нифедипин (рис. 8 С), метаболит M2 в ионизированной форме оставался в водной фазе, откуда экстрагировался после подкисления до pH около 5 (рис. 8 D). Эти эксперименты в сочетании с литературными данными являются вескими доказательствами того, что два пика на хромато-

грамме нифедипина соответствуют разным веществам, а «неизвестный» пик с большой вероятностью относится к метаболиту M2.

Описанный пример ярко демонстрирует необходимость уделять большое внимание условиям хроматографического разделения при разработке биоаналитических методик с применением метода ВЭЖХ–МС/МС. Несмотря на высокую селективность детектирования в режиме MRM, всегда существует риск, что в образце окажутся неизвестные соединения, имеющие близкую молекулярную массу и (или) строение, что приведет к перекрестному детектированию. При недостаточном хроматографическом разделении может быть получен завышенный результат по концентрации аналита. Также хочется отметить, что описанный случай не является уникальным в нашей практике. Ситуация, когда появлялся лишний пик или при применении методики возникали другие неожиданности имеют место практически в каждой пятой методике. Однако при вдумчивом и всестороннем анализе всегда находится объяснение любым нестандартным наблюдениям и отклонениям.

В заключение хотелось бы отметить, что все описанные выше методики были разработаны на оборудовании фирмы Shimadzu (ВЭЖХ-система Nexera с МС/МС-детектором LCMS-8040). Кроме того, вся ежедневная рутинная работа лаборатории фармакокинетики по ТЛМ поводится на данном оборудовании с момента его запуска в ГКБ им. И. В. Давыдовского. При правильной эксплуатации, бережном отношении и соответствующем техническом обслуживании количество поломок минимально. В нашем случае хромато-масс-спектрометр стабильно работает более 5 лет.

Список литературы

1. Родина ТА, Мельников ЕС, Белков СА, Соколов АВ, Прокофьев АВ, Сивков АС. Экспресс-методика определения эналаприла и его основного метаболита эналаприлата в сыворотке крови человека методом ВЭЖХ–МС/МС. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016 (4): 184–9.
2. Rodina TA, Mel'nikov ES, Dmitriev AI, Belkov SA, Sokolov AV, Arkhipov VV, Prokof'ev AB. Simultaneous determination of metoprolol and bisoprolol in human serum by HPLC–MS/MS for clinical drug monitoring. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018 Mar 1; 51 (12): 1111–8.
3. Родина ТА, Мельников ЕС, Белков СА, Данько АА, Соколов АВ, Прокофьев АВ. Терапевтический лекарственный мониторинг нифедипина методом ВЭЖХ–МС/МС при лечении артериальной гипертензии. *Биомедицина*. 2017 (4): 53–69.
4. Rodina TA, Mel'nikov ES, Sokolov AV, Prokof'ev AB, Arkhipov VV, Aksenov AA, Pozdnyakov DL. Rapid HPLC–MS/MS determination of carbamazepine and carbamazepine-10, 11-epoxide. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016 Sep 1; 50 (6): 419–23.
5. Rodina TA, Mel'nikov ES, Aksenov AA, Belkov SA, Sokolov AV, Prokof'ev AB, Ramenskaya GV. HPLC–MS/MS Method for Determining Dabigatran in Human Blood Serum. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018 Mar 1; 51 (12): 1129–37.
6. Rodina TA, Mel'nikov ES, Aksenov AA, Belkov SA, Sokolov AV, Prokof'ev AB, Ramenskaya GV. Development of an HPLC–MS/MS Method for Quantitative Determination of Rivaroxaban in Human Blood Serum. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018 Jul 1; 52 (4): 372–7.
7. Rosa J. et al. Importance of thorough investigation of resistant hypertension before renal denervation: should compliance to treatment be evaluated systematically? // *Journal of human hypertension*. — 2014. — Т. 28. — №. 11. — С. 684.
8. Raemisch K. D., Sommer J. Pharmacokinetics and metabolism of nifedipine // *Hypertension*. — 1983. — Т. 5. — N4 Pt 2. — Pp. 1118.

Для цитирования. Родина Т. А., Мельников Е. С. Терапевтический лекарственный мониторинг в больнице им. И. В. Давыдовского: опыт использования метода ВЭЖХ–МС/МС в практическом здравоохранении // *Медицинский алфавит. Серия «Обзорные»*. — 2019. — Т. 4. — С. 47–52.

