

**ПРОБЛЕМЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА И
КЛИНИЧЕСКОЙ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

УДК 543.51.061:543.54.45:543.8

© Коллектив авторов

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ
ФРАКЦИИ КРОВИ КАК СПОСОБ УНИФИКАЦИИ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА**

П.Г. Лохов, Д.Л. Маслов, О.П. Трифонова, Е.Е. Балашова, А.И. Арчаков*

ФГБУ "Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича" РАМН, Погодинская ул., д.10, стр. 8, 119121 Москва;
факс: (495) 245-0857; эл. почта: lokhovpg@rambler.ru

Описан новый метод терапевтического лекарственного мониторинга, основанный на прямой инъекции низкомолекулярной фракции крови в электроспрейный источник ионизации масс-спектрометра. Данная методика позволяет осуществлять терапевтический лекарственный мониторинг большинства используемых в клинической практике лекарственных веществ. Показаны универсальность и быстрота выполнения метода, что существенно упрощает его повсеместное применение. Аргументирована возможность применения данного метода в подавляющем большинстве случаев лекарственной терапии, как средства контроля назначаемых пациенту доз лекарств и контроля качества самих лекарственных препаратов. В заключении рассмотрены перспективы применения метода в качестве основного средства повышения качества и персонализации лекарственной терапии.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ), капиллярная кровь, персонализация лекарственной терапии, прямая масс-спектрометрия.

ВВЕДЕНИЕ. В данном аналитическом обзоре представлен метод терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ), который основан на применении прямой масс-спектрометрии капиллярной крови. Актуальность и своевременность появления данного метода исходит из современных требований, предъявляемых к рационализации лекарственной терапии. Чтобы понять необходимость создания такого метода, рассмотрим причины нерациональной лекарственной терапии, которые формируют современные требования к ТЛМ, не только как к средству мониторинга концентраций отдельных лекарств в крови пациента, но и как к основному средству персонализации лекарственной терапии.

**1. ПРОБЛЕМА НЕРАЦИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.**

Лекарственная терапия (фармакотерапия) является самым распространённым и доступным способом лечения. Для повышения эффективности фармакотерапии ежегодно внедряется в медицинскую практику новые фармакологические препараты. Однако, вместе с ростом количества и разнообразия применяемых в клинической практике лекарственных средств наметилась тенденция к снижению эффективности

* - адресат для переписки

их использования. Так, в докладе Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) говорится о том, что средний показатель эффективности применяемой лекарственной терапии в настоящее время не превышает 50% [1]. Одновременно с этим отмечен стабильный рост частоты развития нежелательных лекарственных реакций, в том числе приводящих к инвалидности и смерти пациентов [2], что делает проблему рационального использования и безопасности лекарственной терапии актуальной.

По определению ВОЗ, рациональное использование лекарственных средств является *такое их применение, когда больные получают препараты в соответствии с клинической необходимостью, в дозах, отвечающих индивидуальным потребностям, и на протяжении адекватного периода времени* (утверждено на международной конференции в Кении в 1985 году) [3]. В специально проведенных исследованиях было показано, что тяжёлые осложнения в результате нерациональной лекарственной терапии развиваются у миллионов людей. Только в США ежегодно госпитализируется до 9 млн. больных и погибает до 200 тыс. пациентов вследствие применения лекарств [4, 5]. Осложнения после лекарственной терапии занимают 4-6-е место среди причин смерти [6]. Подобная картина наблюдается и в других развитых странах [7]. Результаты проведенных за последние годы фармакоэпидемиологических исследований позволяют говорить о том, что недооценка и запоздалое решение этой проблемы чреваты развитием самых серьезных последствий [6, 8].

По данным Richardson et al. [8], полученным при активном мониторинге использования лекарств в стационаре, основной причиной нерационального использования лекарств в медицинской практике являются врачебные ошибки, в первую очередь ошибки в выборе лекарственного препарата и его дозы. Такого типа ошибки составляют 56%. Второе место заняли врачебные ошибки, связанные с некорректным изменением дозы и длительностью применения лекарственных средств – 34%.

В России Федеральный центр по изучению побочных действий лекарств установил, что на долю сведений об осложнениях вследствие нерациональной лекарственной терапии ввиду врачебных ошибок приходилось 27,4%, среди которых основными являлись передозировка при назначении одного и того же лекарственного вещества под разными фирменными наименованиями и использование комбинированной терапии [9]. Это также подтверждают данные литературы, согласно которым риск осложнений от лекарственной терапии возрастает пропорционально увеличению числа одновременно назначаемых препаратов [10], т.е. при комбинированной лекарственной терапии применяемой сейчас в подавляющем большинстве случаев лечения.

2. ПРОБЛЕМА НЕЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ЛЕКАРСТВ.

Помимо врачебных ошибок, связанных с выбором препаратов и их дозировкой, второй, но не менее значимой причиной, нерациональной лекарственной терапии является неэквивалентность лекарств. Эта проблема связана с высокой стоимостью большинства оригинальных лекарственных веществ, выпускаемых крупными компаниями-монополистами. Поэтому с целью снижения стоимости фармакотерапии ВОЗ рекомендует проведение в медицине политики генерических замен. Однако, эффективность замены оригинального препарата на генерик во многом зависит от качества последнего и его терапевтической эквивалентности оригинальному препарату.

Назначая лекарство, врач рассчитывает на его терапевтическую эквивалентность оригинальному препарату, эффективность и безопасность которого были доказаны в ходе доклинических и клинических исследований. Однако, такое требование как “терапевтическая эквивалентность”

изначально не предъявляется к производству генериков. При производстве и регистрации генерика от производителя требуется лишь показать наличие в нем того же действующего вещества в той же дозе и лекарственной форме, как и в оригинальном лекарстве. При этом допускаются различия сравниваемых препаратов по содержанию активного вещества до 5% и по основным фармакокинетическим параметрам – от +25 до -20% [11]. Более того, в соответствии с рекомендациями ВОЗ в качестве препарата сравнения при изучении биоэквивалентности нового воспроизведенного лекарственного препарата может использоваться не только оригинальный, но и хорошо зарекомендовавший себя генерик [12, 13]. Последнее ещё больше расширяет диапазон потенциальных фармакокинетических различий между генериками и оригинальным препаратом, что существенно влияет на их терапевтическую активность и/или переносимость. Так, в исследовании Nightingale, в котором сравнивался оригинальный препарат кларитромицин и 40 его генериков, находящихся на фармацевтическом рынке 18 стран, было показано, что у 28 препаратов количество активного компонента, высвобождавшегося при растворении, было значительно ниже, чем у оригинального [14]. В других исследованиях показано, что популярные в России генерики азитромицина уступают оригиналу по показателю растворимости, что приводит к изменению его концентрации в крови, терапевтической эффективности и переносимости [15-17].

Все эти факторы показывают насколько важен контроль концентрации действующего вещества в крови пациента при лечении генериками, так как назначение одинаковых схем лечения для оригинальных препаратов и генериков приводит к нерационализации лекарственной терапии. Показательным примером необходимости подобной корректировки доз лекарств при лечении могут служить работы, посвященные исследованию противосудорожных препаратов [11]. В них было показано, что замена оригинального препарата на генерик вызывает необходимость коррекции дозы и/или интервалов между введениями доз. Например, переключение с ламиктала на генерик ламотриджин привело к необходимости увеличить среднюю суточную дозу препарата с 229,5 до 279 мг [11].

3. ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗМА, КАК ПРИЧИНА НЕРАЦИОНАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ.

О большом влиянии индивидуальных особенностей на эффективность и безопасность применения лекарственных препаратов известно с начала возникновения медицины, когда стало ясно, что предсказать как подействует лекарство в каждом конкретном случае крайне сложно. Однако, сегодня контроль вариабельности в действии лекарств на различных пациентах особо актуален, т.к. это является основной проблемой при внедрении новых лекарств [18] и определяет последующие трудности их безопасного применения.

Для многих лекарств оптимальная доза, требуемая для эффективной и безопасной терапии, варьирует от пациента к пациенту (рис. 1А). Каждый конкретный пациент имеет свою кривую зависимости концентрации лекарственного препарата в крови от полученной им дозы препарата, которая определяет проявление терапевтического эффекта, его отсутствие или проявление токсического эффекта. К сожалению, факторы, которые определяют кривую зависимости концентрации лекарственного препарата в крови пациента от полученной им дозы крайне сложны в интерпретации (рис. 1Б). Например, наследственная изменчивость была признана одной из важных причин искажения ответной реакции организма на лекарство ещё в 50-х годах прошлого века [19-21]. Было отмечено, что высокие или низкие

ПРЯМОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ТЛМ

концентрации препаратов в крови наблюдаются у людей с определенными биохимическими особенностями организма, которые наследуются. Более того, отмечено, что существует прямая связь между реакцией на препарат и составом популяции (генетикой), на которой тестировали препарат [22, 23]. Схожие ситуации описаны для целого ряда различных лекарств: правастатина (наблюдается полиморфизм белка-переносчика эфиров холестерина) [24], нейролептиков (полиморфизм дофаминового рецептора D3) [25], гидрохлортиазида (полиморфизм аддуктина) [26], сальбутамола (полиморфизм β 2-адренергического рецептора) [27] и т.д.

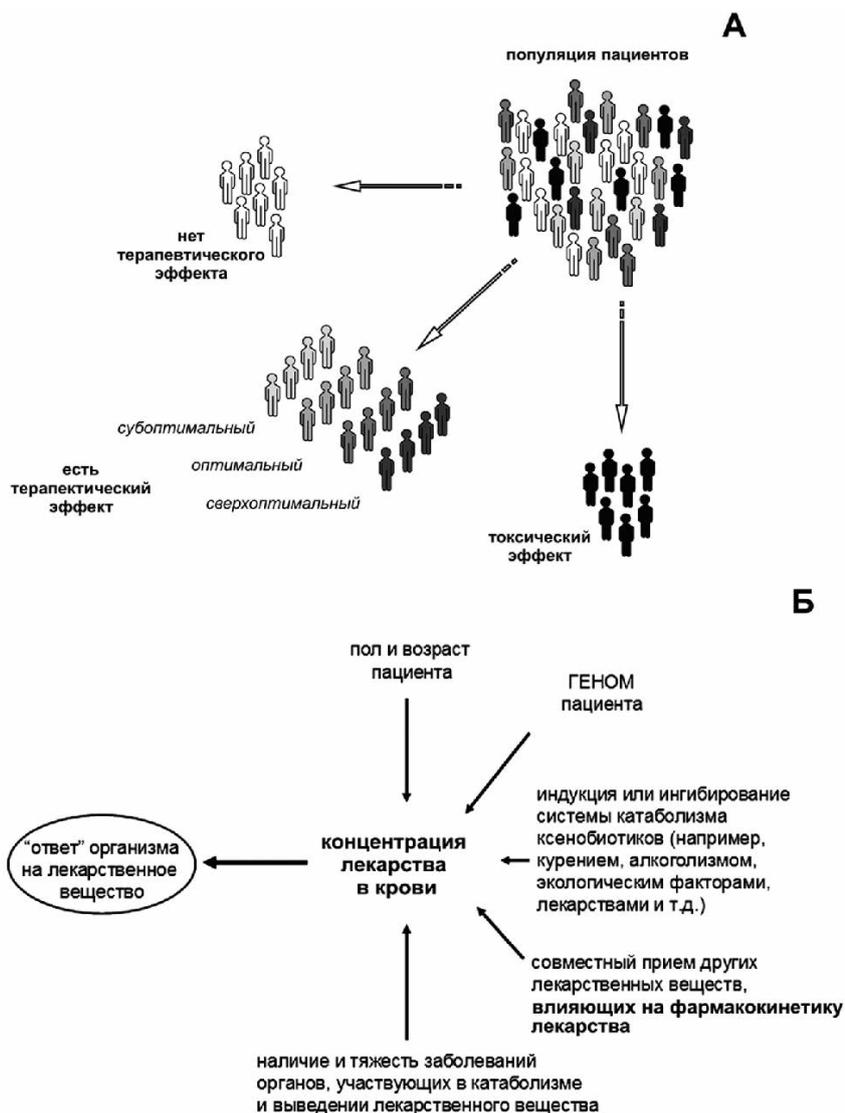


Рисунок 1.

Распределение эффекта действия лекарственного вещества в популяции.

А) Эффект, оказываемый лекарственными препаратами, используемыми в современной клинической практике, при приеме их пациентами в рекомендуемой производителями дозе распределяется следующим образом: у части пациентов не отмечено каких-либо изменений, у другой части наблюдается возникновение токсического эффекта, у третьей части – эффект соответствует ожидаемому, но варьирует от слабого (субоптимальный эффект) до превышающего требуемый эффект. Процентное соотношение этих групп варьирует в зависимости от принимаемого лекарственного средства.

Б) Факторы, влияющие на “ответ” организма на лекарственное вещество.

Однако генетически детерминированная реакция на лекарство в подавляющем большинстве случаев модулируется негеномными факторами [28] (рис. 1Б). Одним из показательных примеров влияния внешних факторов является действие компонентов сока грейпфрута на экспрессию изофермента цитохрома P450 (CYP3A4) и, соответственно, на фармакокинетику многих лекарств, в катаболизме которых принимает участие данный цитохром [28].

К факторам, повсеместно распространённым в популяции и оказывающим модулирующее действие на лекарственную терапию, относятся табакокурение и потребление алкоголя. Известно, что индукция печеночных ферментов системы цитохрома P450 под действием никотина и алкоголя приводит к усилению метаболизма препаратов и тем самым, снижает их концентрацию в крови [29, 30]. Это относится в первую очередь к снотворным, болеутоляющим, противодиабетическим средствам [31]. Известно, что люди, постоянно употребляющие алкоголь, становятся мало восприимчивы к действию наркотических и обезболивающих средств [32]. С другой стороны, алкоголь может ускорять всасывание лекарств из пищеварительного тракта, создавая в организме более высокие концентрации препарата, чем при обычном приеме. Это приводит к передозировке или развитию токсических реакций [33]. Также установлено, что никотин снижает диурез [34]. Соответственно, при назначении лекарственных препаратов, выводящихся через почки, можно ожидать замедления скорости их элиминации. Перечисленные примеры показывают, что факторы, влияющие на катаболизм и выведение лекарственного вещества, изменяют его фармакокинетику и могут привести к серьезным нежелательным последствиям для здоровья пациента при лекарственной терапии (рис. 2).

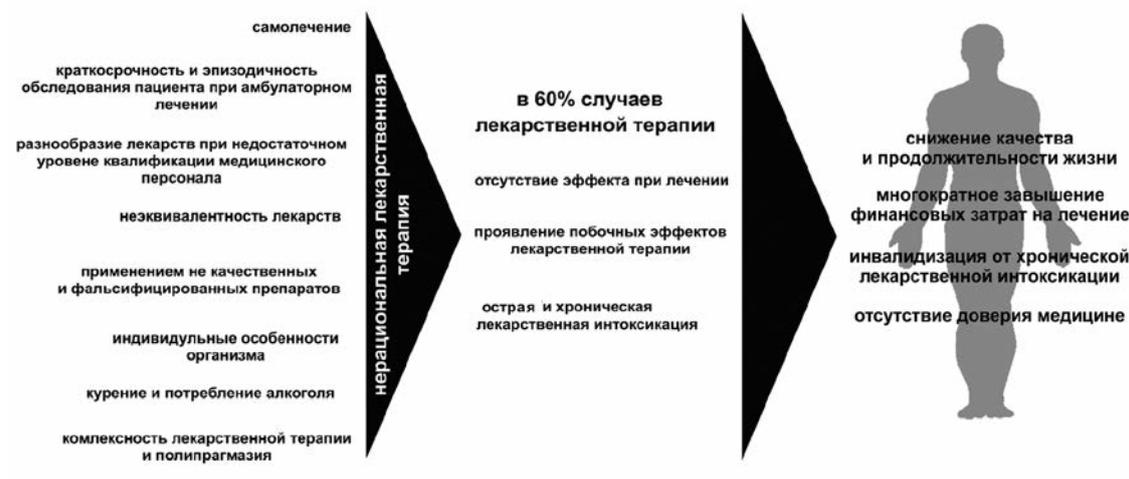


Рисунок 2.

Причины и последствия нерациональной лекарственной терапии.

4. ТЛМ КАК СПОСОБ ПЕРСОНАЛИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ.

Неблагоприятные побочные реакции, возникающие в результате врачебных ошибок, являются потенциально предотвратимыми, поскольку их можно избежать. Решением этой проблемы может стать проведение терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ).

ПРЯМОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ТЛМ

Терапевтический лекарственный мониторинг – контроль концентрации лекарственного вещества в плазме крови с целью подбора индивидуального режима дозирования препарата. Оценка концентрации действующего вещества в крови пациента и коррекция дозировки препарата на основе полученных данных позволяют избежать нежелательных побочных эффектов или отсутствия/снижения терапевтического эффекта от приема любого лекарственного средства.

ТЛМ реализуется путём регистрации в крови концентрации лекарственного вещества, и корректировки его дозы на основе фармакокинетической модели, рассчитанной для среднестатистического пациента. В настоящее время терапевтический лекарственный мониторинг активно используется в клинической практике. В частности, в западной Европе и США запрещено назначать любые сильнодействующие лекарственные препараты (психостимуляторы, психотропные лекарства, антидепрессанты и пр.) и препараты длительного применения (гипотензивные, противоастматические, кардиостимуляторы) без контроля их концентрации в крови пациента (www.iatdmct.org, www.bps.ac.uk). В России ТЛМ подлежат всего пятьдесят лекарственных веществ (приказ Минздрава России от 21 февраля 2000 г. N 64). Очевидно, что столь скудный список лекарств, обязательных для ТЛМ в России, является вынужденно ограниченным и компромиссным, так как применение ТЛМ приводит к существенному удорожанию лечения.

5. ТЕХНИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ ТЛМ.

На сегодняшний день разработано достаточно большое количество методов, позволяющих определять концентрацию лекарственных веществ в биологических жидкостях: хроматографические, микробиологические, спектрофотометрические, полярографические, иммунологические (радиоиммунные, иммуноэнзимные), радиоизотопные [35]. В современной практике наиболее распространенным методом качественного и количественного определения содержания лекарственных веществ в биологических субстратах являются так называемые “гибридные” методы. Под этим термином подразумевается комбинация масс-спектрометрии с хроматографическими методами разделения (например, ВЭЖХ-МС или ГХ-МС) [36]. На сегодняшний день разработаны методики хромато-масс-спектрометрического определения достаточно большого количества лекарственных веществ (противоопухолевые средства, сердечные гликозиды, антидепрессанты, карбапенемовые антибиотики, азитромицин, сертралин) в различных биологических образцах [37-40]. Однако, наряду с большим количеством явных преимуществ и у этого подхода (ВЭЖХ-МС) есть свои недостатки.

Одним из главных моментов, ограничивающих внедрение ТЛМ на основе ВЭЖХ-МС в широкую клиническую практику, является отсутствие унифицированных методик анализа. Для определения каждого лекарственного вещества применяется своя процедура подготовки пробы и своя методика ВЭЖХ анализа, которые в каждом отдельном случае требуют использования хроматографических колонок с разными сорбентами, различных протоколов хроматографии, разных элюентов и условий детекции препарата. Очевидно, что эти обстоятельства приводят к увеличению продолжительности времени выполнения анализа и требуют высокой квалификации персонала, что существенно повышает стоимость анализа. Подобное положение вещей формирует запрос на внедрение новых, более современных методов ТЛМ, в частности использующих последние достижения в области аналитического (в частности, масс-спектрометрического) оборудования.

6. СОВРЕМЕННЫЙ ВАРИАНТ РЕАЛИЗАЦИИ ТЛМ.

Решением проблемы унификации и удешевления методов контроля лекарственной терапии является применение современных масс-спектрометров, позволяющих одновременно детектировать большие группы лекарственных веществ в крови [41]. Одним из таких методов является метод прямого ввода (в зарубежной литературе известен как DIMS – direct infusion mass spectrometry) исследуемого раствора непосредственно в источник ионизации масс-спектрометра, измеряющего массы веществ с высокой точностью (до тысячных дальтона) и разрешением (более 50 тысяч; разрешение, в данном случае, отношение высоты масс-спектрометрического пика к его ширине, измеренной на 50% его высоты). Данный метод успешно и широко используется при метаболомных исследованиях [42-46]. Так, с применением прямой масс-спектрометрии, при метаболомном исследовании плазмы крови одновременно и с высокой степенью воспроизводимости детектируют в течение одной минуты до 3 тысяч низкомолекулярных веществ. Подобные технические достижения полностью совпадают с целями ТЛМ, то есть с детекцией большой совокупности низкомолекулярных веществ в крови, к которым относятся подавляющее большинство лекарственных веществ. Данное обстоятельство закономерно привело к возникновению варианта реализации ТЛМ на основе прямой масс-спектрометрии (далее используется сокращение пм-ТЛМ).

Одно из основных преимуществ пм-ТЛМ заключается в отсутствии хроматографии, обычно используемой отдельно, либо совместно с масс-спектрометрической детекцией при классических схемах реализации ТЛМ. Исключение из схемы анализа хроматографии позволяет ускорить и снизить стоимость ТЛМ. Отсутствие же хроматографического разделения веществ перед их масс-спектрометрической детекцией, компенсируется применением масс-спектрометров с высокой разрешающей способностью детекции масс анализируемых веществ.

Второе основное преимущество пм-ТЛМ, это одномоментная регистрация всего разнообразия лекарственных веществ в плазме крови. Как было сказано выше, возможность одномоментной регистрации тысяч низкомолекулярных веществ прямой масс-спектрометрией регулярно демонстрируется в метаболомных исследованиях [42]. Учитывая, что увеличение частоты возникновения медицинских ошибок при дозировке лекарств наблюдается при комбинированной лекарственной терапии [10], то определение концентраций совокупности лекарств методом пм-ТЛМ отвечает современным требованиям, предъявляемым к рационализации фармакотерапии.

Последнее, но не менее значимое преимущество пм-ТЛМ, определяющее лёгкость его внедрения по сравнению с другими методами ТЛМ, это возможность использования микроколичеств биоматериала. Подобное свойство объясняется высокой чувствительностью современных приборов, используемых при прямой масс-спектрометрии, и позволяет вместо значительных объёмов венозной крови, используемой сейчас при ТЛМ, применять капиллярную кровь. Следует отметить, что получение капиллярной крови является единственным способом получить кровь для анализов, который пациент может выполнить самостоятельно в домашних условиях с применением автоматического скарификатора, подобно тому, как это делают больные диабетом для контроля уровня глюкозы в крови. Очевидно,

ПРЯМОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ТЛМ

что возможность самостоятельного получения биоматериала для ТЛМ и отправка его в лабораторию, делает пациента участником контроля и рационализации лекарственной терапии.

В литературе уже описаны несколько случаев положительного применения метода прямой масс-спектрометрии с использованием электроспрейной ионизации (ЭС-МС) для количественного определения лекарственных средств в плазме крови [47, 48]. Использование стандартных растворов в качестве внутреннего стандарта позволило установить линейную зависимость (коэффициент корреляции 0,98) между концентрацией исследуемого лекарственного вещества и отношением интенсивностей ионов анализируемого соединения и внутреннего стандарта, что позволило, в конечном итоге, установить минимальные пределы обнаружения лекарственного вещества – $1,5 \times 10^{-8}$ М [47]. В другой работе показана возможность измерения прямой масс-спектрометрией анестетиков ропивакаина и бупивакаина [48], при этом минимально детектируемая концентрация препаратов в крови составляла 8,7 и $8,4 \times 10^{-8}$ М, соответственно, и наблюдалась линейная зависимость интенсивности их масс-спектрометрических пиков от концентрации в крови вплоть до $8,7$ и $8,4 \times 10^{-5}$ М, соответственно.

Лимитирующим фактором применения масс-спектрометров для ТЛМ с использованием метода прямого ввода является динамический диапазон детекции масс веществ. Это связано с самим принципом метода прямого ввода – одновременный ввод всего спектра низкомолекулярных веществ крови без какого-либо их предварительного разделения. При пм-ТЛМ детекция происходит в плазме (или цельной) крови, которая сама содержит более тысячи различных низкомолекулярных веществ (так называемый метаболом плазмы крови). Типичный образец масс-спектра низкомолекулярных веществ плазмы, снятого в режиме детекции положительно заряженных ионов, представлен на рисунке 3А. Как правило, наиболее интенсивными пиками в масс-спектре являются пики ионов фосфолипидов, общая концентрация которых в сыворотке крови $\sim 2,5 \times 10^{-3}$ М. При этом наиболее интенсивный пик масс-спектра соответствует фосфолипиду с концентрацией $\sim 2,5 \times 10^{-5}$ М.

Согласно техническим характеристикам, динамический диапазон детекции масс веществ на современном масс-спектрометре (например, MicrOTOF-Q, Bruker Daltonics) составляет не менее пяти порядков. Таким образом, предел детекции при прямой масс-спектрометрии низкомолекулярных веществ плазмы крови составляет $\sim 2,5 \times 10^{-10}$ М (см. рис. 3А). Однако фактический диапазон эффективного измерения концентраций лекарственных веществ на два порядка меньше. Наиболее значимой характеристикой, снижающей динамический диапазон, является так называемый “химический шум” возникающий в результате детектирования прибором сигналов от ионов, не являющихся объектами исследования – сигналы от ионов растворителя, различных примесей, попавших в исследуемый раствор и т. д. Сигнал, имеющий значение интенсивности ниже показателя интенсивности “шума”, не может быть идентифицирован. Это уменьшает “рабочий” динамический диапазон примерно на 1 порядок. Ещё на один порядок “рабочий” динамический диапазон уменьшается ввиду того, что для точного измерения величины масс-спектрометрического пика необходимо, чтобы соотношение сигнал/шум было не менее 10, чтобы нивелировать влияние шума на точность

измерений. Таким образом, теоретически все вещества в концентрации $>2,5 \times 10^{-8}$ М должны регистрироваться прямой масс-спектрометрией при пм-ТЛМ. Рисунок 3Б показывает, что лекарственные вещества, подлежащие ТЛМ, имеют минимальную терапевтическую концентрацию в плазме крови выше этого порога и, соответственно, могут контролироваться методом пм-ТЛМ. Возможность детекции и идентификации лекарственных веществ в капле крови при пм-ТЛМ, наглядно продемонстрирована на рисунках 4 и 5.

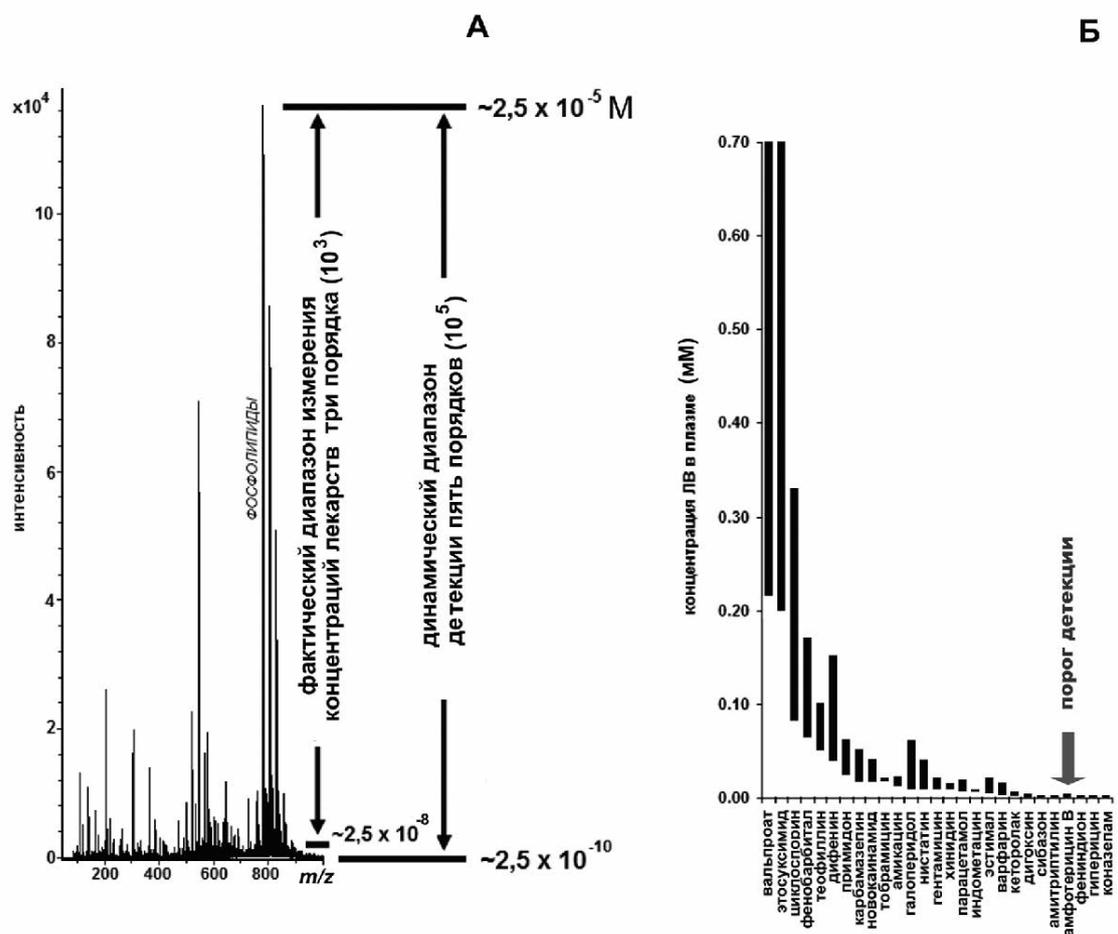


Рисунок 3.

Динамический диапазон детекции масс низкомолекулярных веществ при прямой масс-спектрометрии плазмы крови и диапазон терапевтических концентраций лекарственных веществ, подлежащих ТЛМ.

- А) Масс-спектр низкомолекулярных веществ плазмы крови (также известен как метаболом плазмы крови). Масс-спектр получен прямой инъекцией безбелковой фракции крови в электроспрейный источник ионизации квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра (MicrOTOF-Q, Bruker Daltonics). Диапазон детекции масс ионов веществ m/z 50-1000.
- Б) Порог детекции веществ при прямой масс-спектрометрии и терапевтические дозы лекарственных веществ, подлежащих ТЛМ. Верхняя граница столбиков соответствует концентрации максимальной терапевтической дозы, нижняя – минимальной.

Рисунок масс-спектра адаптирован из [44].

ПРЯМОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ТЛМ

Леводопа – эффективное и широко используемое лекарственное средство при болезни Паркинсона [49], основу которого составляет прямой предшественник нейромедиатора дофамина – диоксифенилаланин, входящий также в состав препаратов Дуэллин, Карбидопа, Леводопа-Тева, Синдопа, Синемет и т.д.. Однако, после 4-5 лет лечения препаратом леводопа появляются двигательные расстройства, такие как дискинезии, связанные в основном с фармакокинетикой диоксифенилаланина. Поэтому контроль концентрации диоксифенилаланина в плазме крови больных болезнью Паркинсона представляет особый клинический интерес [49-52]. Согласно данным Nutt и Woodward [50], минимальная эффективная концентрация диоксифенилаланина в плазме крови колеблется от 3 до 15×10^{-6} М. Рисунок 4А наглядно демонстрирует масс-спектрометрическую детекцию диоксифенилаланина прямой масс-спектрометрией, используемой при пм-ТЛМ, при его концентрации в крови значительно меньшей чем минимальная терапевтическая доза. При этом, детекция диоксифенилаланина в крови возможна в широком диапазоне концентраций (до четырёх порядков), так как площадь масс-спектрометрического пика (нормированная по площади пика контрольного вещества) линейно зависит от концентрации диоксифенилаланина в крови (рис. 4Б).

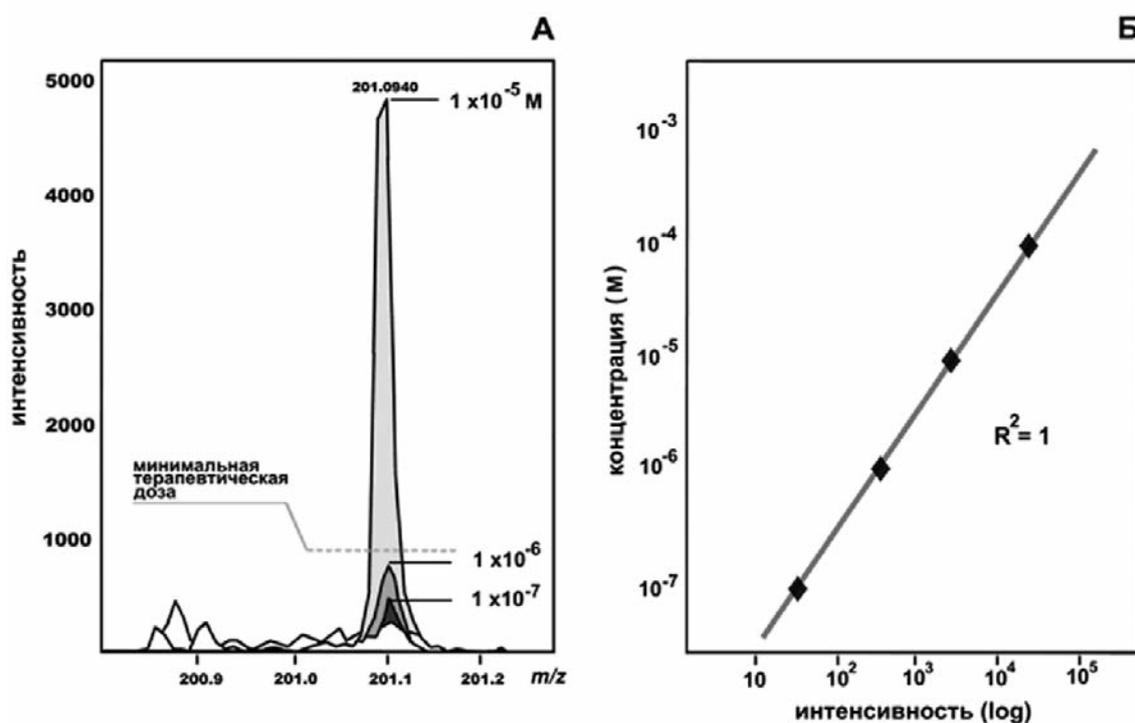


Рисунок 4.

Масс-спектрометрическая детекция диоксифенилаланина в крови пациента при пм-ТЛМ.

А) Интенсивность масс-спектрометрического пика при различной концентрации диоксифенилаланина в крови. Концентрация диоксифенилаланина 1×10^{-7} М детектируется в крови и значительно ниже минимальной концентрации препарата, оказывающей терапевтическое действие (3×10^{-6} М [50]). Спектры получены в режиме детекции положительно заряженных ионов на квадруполь-время пролетном масс-спектрометре (MicrOTOF-Q, Bruker Daltonics).

Б) Линейная зависимость логарифма площади масс-спектрометрического пика от различной концентрации диоксифенилаланина в крови. R^2 - достоверность аппроксимации данных прямой линией.

Рисунок сделан авторами на основе собственных данных.

Рисунок 5 наглядно демонстрирует возможность идентификации лекарственных веществ при пм-ТЛМ путем фрагментации в масс-спектрометре молекулы лекарственного вещества. В частности, при фрагментации молекулы, предположительно относящейся к левомицетину (противомикробный препарат широкого спектра действия), наблюдаются фрагменты развала молекулы со специфическими для левомицетина массами (m/z 152, 194 и 257 [53]), что однозначно идентифицирует его в исследуемом образце крови. Следует отметить, что идентификация левомицетина продемонстрирована при его концентрации в крови в десять раз меньше минимальной терапевтической концентрации, что указывает на высокую чувствительность данного способа идентификации.

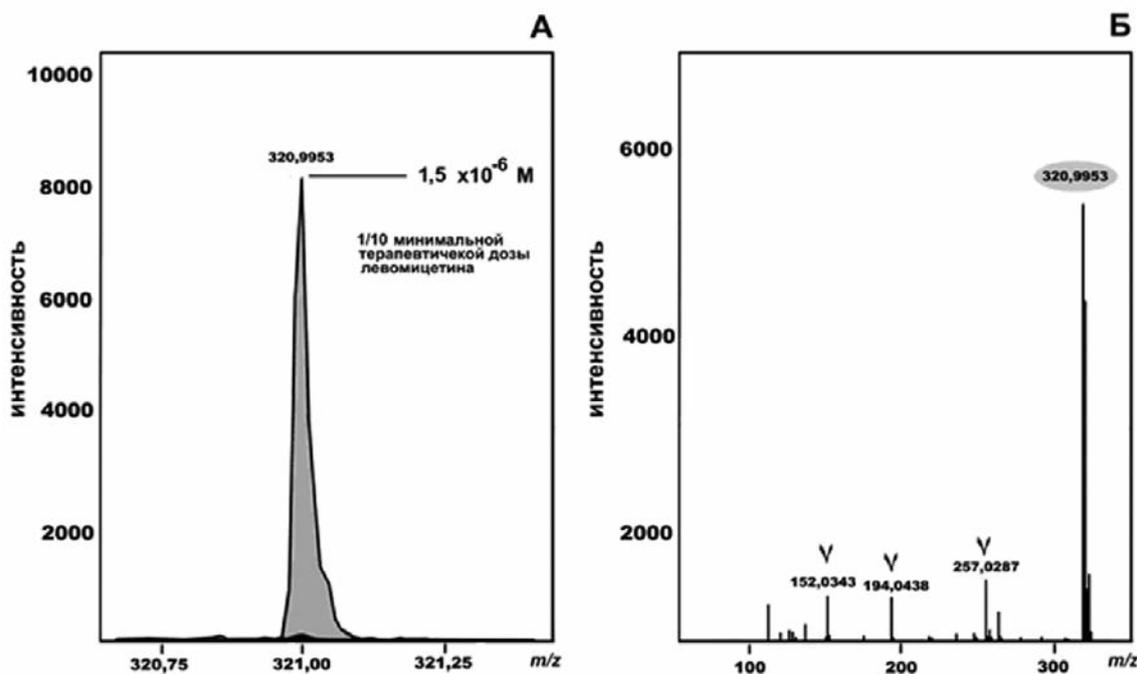


Рисунок 5.

Масс-спектрометрическая детекция в крови левомицетина при пм-ТЛМ и подтверждение его идентификации путем фрагментации.

А) Масс-спектрометрический пик левомицетина при его концентрации в крови $1,5 \times 10^{-6} M$ и анализе крови методом прямой масс-спектрометрии при пм-ТЛМ. Указанная концентрация составляет одну десятую минимальной терапевтической концентрации препарата в крови.

Б) Фрагментация представленного на рисунке А масс-спектрометрического пика левомицетина (измеренная масса иона m/z 320,9953) на специфические фрагменты (m/z 152, 194 и 257 [53]), которые однозначно идентифицируют левомицетин.

Спектры получены в режиме детекции отрицательно заряженных ионов на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре (MicrOTOF-Q, Bruker Daltonics).

Рисунок сделан авторами на основе собственных данных.

7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВИ ДЛЯ ПМ-ТЛМ.

Большинство методов, применяемых для ТЛМ, основано на измерении концентрации лекарственных веществ в венозной крови. Причиной этого была низкая чувствительность используемых методов и, как следствие, необходимость получения относительно больших (несколько миллилитров) объемов крови для проведения анализа. Современные методы детекции

ПРЯМОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ТЛМ

веществ, основанные на масс-спектрометрии, отличаются высокой чувствительностью и не требуют для ТЛМ больших объемов крови. Именно поэтому в последние годы наметилась тенденция замены в ТЛМ венозной крови на капиллярную, получение которой существенно проще [54-57]. Так, был выполнен ряд научных работ, доказывающих возможность выполнения терапевтического лекарственного мониторинга с использованием капиллярной крови для некоторых классов препаратов: противовоспалительные и жаропонижающие [58], противоэпилептические [59], противокашлевые препараты [60], иммуносупрессоры [61].

Для более широкого внедрения методов ТЛМ, использующих для анализа капиллярную кровь, в том числе и пм-ТЛМ, возможно также использование специального коэффициента пересчета. Коэффициент позволяет использовать уже сертифицированные на венозной крови методики ТЛМ в приложении их к методам ТЛМ, использующим капиллярную кровь, путём простого умножения полученных показателей на этот коэффициент. Для некоторых лекарственных препаратов этот коэффициент был получен эмпирическим путем и, как правило, близок к 1 (от 0,84 до 1,13 [57, 62-70]). Следует также отметить, что для лекарственных веществ, для которых эмпирически коэффициент пересчета не установлен, можно применять формулу пересчёта, известную как поправку на гематокрит [61, 71-77]. Таким образом, при использовании эмпирически полученных коэффициентов или соответствующих формул, возможно применение существующих фармакокинетических моделей, созданных с использованием венозной крови, при ТЛМ с использованием капиллярной крови, в том числе и при пм-ТЛМ.

8. ЛИМИТИРУЮЩИЕ ФАКТОРЫ ПМ-ТЛМ.

Помимо предела чувствительности в детекции веществ, еще одним немаловажным показателем, лимитирующим возможности детектирования изучаемого вещества при прямой масс-спектрометрии, является способность этого вещества к ионизации в электроспреевом источнике ионизации масс-спектрометра. Ионизация вещества, следовательно, и уровень его сигнала, находятся в прямой зависимости от способности присоединять (в случае фиксации сигнала в режиме детекции положительно заряженных ионов) или отдавать (в случае фиксации сигнала в режиме детекции отрицательно заряженных ионов) протон. К сожалению, до настоящего времени нет достоверной методики предварительного расчета этого показателя. Возможно только с той или иной долей вероятности, на основании анализа химического строения изучаемого вещества и знаний, полученных эмпирическим путем (к примеру, отмечено, что аминокислоты имеют высокое сродство к протону, а сульфо- группы и фосфо-группы легко отдают протон) предположить насколько хорошо или плохо будет ионизироваться анализируемое лекарственное вещество.

Другим лимитирующим фактором применения пм-ТЛМ является интерференция (наложение) масс-спектрометрических пиков от разных веществ при прямой масс-спектрометрии. Как писалось выше, при пм-ТЛМ применяются современные масс-спектрометры с высокой разрешающей способностью, что минимизирует вероятность интерференции, однако не исключает ее. В случае возникновения интерференции необходимо применять пм-ТЛМ совместно с хроматографическим разделением [42].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Появление эффективных аналитических приборов, таких как масс-спектрометры, позволяющие с высокой чувствительностью и одновременно анализировать множество лекарственных веществ,

кардинально меняет облик ТЛМ, делая его доступным для широкого применения. Отсутствие необходимости проведения экстракции лекарств из плазмы крови, или проведение длительной и дорогостоящей хроматографии, а также возможность использования для масс-спектрометрического анализа микроколичеств капиллярной крови (т.е. возможность пациенту самому в домашних условиях получить образец крови для ТЛМ), существенно снижают стоимость ТЛМ и делают его доступным каждому пациенту.

В свою очередь, доступность ТЛМ является предпосылкой к повсеместному его применению и, соответственно, изменению качества лечения в результате появления независимого контроля проведения лекарственной терапии. Контроль целесообразности одновременного применения тех или иных лекарств, их доз, а также своевременное обнаружение врачебных ошибок и ошибок, появляющихся в результате применения некачественных лекарственных препаратов, может являться существенной причиной кардинального улучшения качества врачебной медицинской помощи.

Данная работа поддержана программой "Протеомика в медицине и биотехнологии", программой "Протеом человека" Российской Академии Медицинских Наук и государственным контрактом № 16.522.12.2002 Министерства Образования и Науки Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Medicines: rational use of medicines. (2010) Fact sheet N338. World Health Organization. Geneva.
2. *Samani N.J., Tomaszewski M., Schunkert H.* (2010) *Lancet*, **375**, 1497-1498.
3. The Rational Use of Drugs - Report of the Conference of Experts. (1985) Nairobi 25-29 November. World Health Organization. Geneva.
4. *Johnson J.A., Bootman J.L.* (1995) *Arch. Intern. Med.*, **155**, 1949-1956.
5. *Ernst F.R., Grizzle A.J.* (2001) *J. Am. Pharm. Assoc. (Wash)*, **41**, 192-199.
6. *Seeger J.D., Kong S.X., Schumock G.T.* (1998) *Pharmacotherapy*, **18**, 1284-1289.
7. *Imbs J.L., Pouyanne P., Haramburu F., Welsch M., Decker N., Blayac J.P., Begaud B.* (1999) *Therapie*, **54**, 21-27.
8. *Richardson W.C., Berwick D.M., Bisgard J.C., Bristow L.R., Buck C.R., Cassel C.K., Coyle M.J., Detmer D.E., Grossman J.H., James B., Lawrence D.M., Leape L., Levin A., Robinson-Beale R., Scherger J.E., Southam A.M., Wakefield M., Warden G.L., Corrigan J.M.* (2000) *MedGenMed*, **2**, E42.
9. *Ленахин В.К., Астахова А.В., Овчинникова Е.А., Овчинникова Л.К.* (2002) *Качественная клиническая практика*, **1**, (<http://medi.ru/doc/9920111.htm>).
10. *Истратов С.Ю., Брайцева Е.В., Вартамян И.Р.* (2000) *Новая аптека*, **9**, 34-38.
11. *Хубиева М.Ю., Юргель Н.В., Ушлакова Е.А., Малин А.А., Хубиева А.Ю.* (2010) *Здравоохранение*, **11**, 15-27.
12. *Мешковский А.П.* (2003) *Фарматека*, **3**, 103-108.
13. *Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А.* (2003) *Фарматека*, **3**, 109-111.
14. *Nightingale C.H.* (2005) *Clin. Drug Investig.*, **25**, 135-152.
15. *Панюшин Р.* (2003) *Фарм. вестник.*, **16**, 23-25.
16. *Смоленов И.В., Красильникова А.В.* (2003) *Фарматека*, **3**, 78-87.

17. *Contopoulos-Ioannidis D.G., Ioannidis J.P., Chew P., Lau J.* (2001) *J. Antimicrob. Chemother.*, **48**, 691-703.
18. *Ma Q., Lu A.Y.* (2011) *Pharmacol. Rev.*, **63**, 437-459.
19. *Kalow W., Gunn D.R.* (1959) *Ann. Hum. Genet.*, **23**, 239-250.
20. *Evans D.A., Manley K.A., Mc K.V.* (1960) *Br. Med. J.*, **2**, 485-491.
21. *Kalow W., Staron N.* (1957) *Can. J. Biochem. Physiol.*, **35**, 1305-1320.
22. *Vesell E.S.* (1989) *Pharmacol. Ther.*, **41**, 535-552.
23. *Kalow W., Tang B.K., Endrenyi L.* (1998) *Pharmacogenetics*, **8**, 283-289.
24. *Vesell E.S.* (1997) *Ann. Intern. Med.*, **126**, 653-655.
25. *Sivagnanasundaram S., Morris A.G., Gaitonde E.J., McKenna P.J., Mollon J.D., Hunt D.M.* (2000) *Neurosci. Lett.*, **279**, 13-16.
26. *Glorioso N., Manunta, P., Filigheddu, F.* (1999) *Hypertension*, **34**, 649-654.
27. *Ober C., Hoffjan S.* (2006) *Genes and Immunity*, **7**, 95-100.
28. *Gutiu I.A., Andries, A., Radulescu F., Georgescu A-M., Cioaca, D.* (2010) *Rom. J. Intern. Med.*, **48**, 187-191.
29. *Buck M.L.* (1997) *Pediatr. Pharmacother.*, **3**, 211-216.
30. *Meyer J.M., Rodvold K.A.* (1996) *Infect. Med.*, **13**, 463-464.
31. *Каркищенко Н.Н.* (1996) Фармакологические основы терапии: Руководство и справочник для врачей и студентов. Москва, ИМП-Медицина.
32. *Харкевич Д.А.* (1999) Фармакология, Москва, ГЭОТАР МЕДИЦИНА.
33. *Кудрин А.Н., Пономарев, В.Д., Макаров, В.А.* (1977) Рациональное применение лекарств: серия "Медицина". Москва, Знание.
34. *Могош Г.* (1986) Острые отравления. Диагноз, лечение, Бухарест.
35. *Zhao W., Jacqz-Aigrain E.* (2011) *Handb. Exp. Pharmacol.*, **205**, 77-90.
36. *Федотов Ю.А., Мирошниченко И.И., Горшкова Е.В., Иващенко А.А.* (2008) Качественная клиническая практика, **3**, 29-36.
37. *Jain D.S., Sanyal M., Subbaiah G., Pande U.C., Shrivastav P.* (2005) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **829**, 69-74.
38. *Stokvis E., Rosing H., Beijnen J.H.* (2005) *Mass Spectrom. Rev.*, **24**, 887-917.
39. *Marquet P.* (2002) *Ther. Drug. Monit.*, **24**, 255-276.
40. *Писарев В.В., Смирнова Л.Б., Москалева Н.Е. и др.* (2004) *Клин. Фармакокин.*, **1**, 23-26.
41. *Федорова Г.А., Кожанова Л.А.* (2007) в: Хроматография на благо России, Москва, Граница, сс. 666-684.
42. *Lokhov P.G., Archakov A.I.* (2008) *Биомед. Химия*, **54**, 497-511.
43. *Lokhov P.G., Dashtiev M.I., Bondartsov L.V., Lisitsa A.V., Moshkovskii S.A., Archakov A.I.* (2009) *Биомед. Химия*, **55**, 247-254.
44. *Lokhov P.G., Dashtiev M.I., Moshkovskii S.A., Archakov A.I.* (2010) *Metabolomics*, **6**, 156-163.
45. *Lokhov P.G., Kharybin O.N., Archakov A.I.* (2012) *Int. J. Mass Spectrom.*, **309**, 200-205.
46. *Lokhov P.G., Trifonova O.P., Maslov D.L., Archakov A.I.* (2013) *Eur. J. Cancer Prev.*, **22**, 335-341.
47. *Karatasso Y.O., Logunova I.V., Sergeeva M.G., Nikolaev E.N.* (2007) *Pharmac. Chem. J.*, **41**, 166-169.
48. *Salama N.N., Wang S.* (2008) *Anal. Chem. Insights*, **4**, 11-19.
49. *Muenter M.D., Tyce G.M.* (1971) *Mayo Clin. Proc.*, **46**, 231-239.
50. *Nutt J.G., Woodward W.R.* (1986) *Neurology*, **36**, 739-744.
51. *Nutt J.G.* (1987) *Ann. Neurol.*, **22**, 535-540.
52. *Sage J.I., Mark M.H., McHale D.M., Sonsalla P.K., Vitagliano D.* (1991) *Ann. Neurol.*, **29**, 623-628.

53. Tyagi A., Vernekar P., Karunasagar I. (2008) Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess., **25**, 432-437.
54. Liu G., Patrone L., Snapp H.M., Batog A., Valentine J., Cosma G., Tymiak A., Ji Q.C., Arnold M.E. (2010) Bioanalysis, **2**, 1405-1414.
55. Liang X., Jiang H., Chen X. (2010) Bioanalysis, **2**, 1437-1448.
56. Dayre McNally J., Matheson L.A., Sankaran K., Rosenberg A.M. (2008) J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **112**, 164-168.
57. Webb N.J., Roberts D., Preziosi R., Keevil B.G. (2005) Pediatr. Transplant., **9**, 729-733.
58. Spooner N., Lad R., Barfield M. (2009) Anal. Chem., **81**, 1557-1563.
59. la Marca G., Malvagia S., Filippi L., Fiorini P., Innocenti M., Luceri F., Pieraccini G., Moneti G., Francese S., Dani F.R., Guerrini R. (2008) J. Pharm. Biomed. Anal., **48**, 1392-1396.
60. Liang X., Li Y., Barfield M., Ji Q.C. (2009) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., **877**, 799-806.
61. Cheung C.Y., van der Heijden J., Hoogtanders K., Christiaans M., Liu Y.L., Chan Y.H., Choi K.S., van de Plas A., Shek C.C., Chau K.F., Li C.S., van Hooff J., Stolk L. (2008) Transpl. Int., **21**, 140-145.
62. Ritzmo C., Albertioni F., Cosic K., Soderhall S., Eksborg S. (2007) Ther. Drug Monit., **29**, 447-451.
63. Palm C., Bjork O., Bjorkholm M., Eksborg S. (2001) Anticancer Drugs, **12**, 859-864.
64. Gordi T., Hai T.N., Hoai N.M., Thyberg M., Ashton M. (2000) Eur. J. Clin. Pharmacol., **56**, 561-566.
65. Merton G., Jones K., Lee M., Johnston A., Holt D.W. (2000) Ther. Drug Monit., **22**, 594-598.
66. Pettersen M.D., Driscoll D.J., Moyer T.P., Dearani J.A., McGregor C.G. (1999) Transpl. Int., **12**, 429-432.
67. Yonan N., Martyszczuk R., Machaal A., Baynes A., Keevil B.G. (2006) Clin. Transplant., **20**, 221-225.
68. Umstead G.S., McKernan T. (1981) J. Am. Geriatr. Soc., **29**, 34-36.
69. Hocher B., Gron H.J., Schumann C., Tsuprykov O., Seifert S., Hitzler W.E., Armbruster F.P. (2012) Clin. Lab., **58**, 851-855.
70. Craft N.E., Haitema T., Brindle L.K., Yamini S., Humphrey J.H., West K.P. Jr. (2000) J. Nutr., **130**, 882-885.
71. Garcia Boy R., Henseler J., Mattern R., Skopp G. (2008) Ther. Drug. Monit., **30**, 733-739.
72. Hoogtanders K., van der Heijden J., Christiaans M., Edelbroek P., van Hooff J.P., Stolk L.M. (2007) J. Pharm. Biomed. Anal., **44**, 658-664.
73. Koal T., Burhenne H., Romling R., Svoboda M., Resch K., Kaefer V. (2005) Rapid Commun. Mass Spectrom., **19**, 2995-3001.
74. van der Heijden J., de Beer Y., Hoogtanders K., Christiaans M., de Jong G.J., Neef C., Stolk L. (2009) J. Pharm. Biomed. Anal., **50**, 664-670.
75. la Marca G., Malvagia S., Filippi L., Luceri F., Moneti G., Guerrini R. (2009) Epilepsia, **50**, 2658-2662.
76. Eyles D., Anderson C., Ko P., Jones A., Thomas A., Burne T., Mortensen P.B., Norgaard-Pedersen B., Hougaard D.M., McGrath J. (2009) Clin. Chim. Acta, **403**, 145-151.
77. Li W., Tse F.L. (2010) Biomed. Chromatogr, **24**, 49-65.

Поступила: 28. 05. 2013.

MASS SPECTROMETRY OF BLOOD LOW-MOLECULAR FRACTION AS A METHOD FOR UNIFICATION OF THERAPEUTIC DRUG MONITORING

P.G. Lokhov, D.L. Maslov, O.P. Trifonova, E.E. Balashova, A.I. Archakov

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10., Moscow, 119121 Russia; fax: (495) 245-0857; e-mail: lokhovpg@rambler.ru

The article describes a new therapeutic drug monitoring (TDM) method based on direct infusion of low-molecular fraction of blood into electrospray ionization source of mass spectrometer. This technique allows performing TDM of almost all drugs used in clinic. In article, the universality and high-throughput of the method, that significantly simplifies its wide application, have been shown. Moreover, the possibility of method application in most cases of drug therapy has been argued as a tool of control of drug doses, rationality of drug therapy, and the quality of the drugs themselves. In conclusion, the prospects for application of the method as primary means of improving the quality and personalization of drug therapy have been discussed.

Key words: mass spectrometry, therapeutic drug monitoring (TDM), capillary blood, personalize drug therapy, direct mass spectrometry.