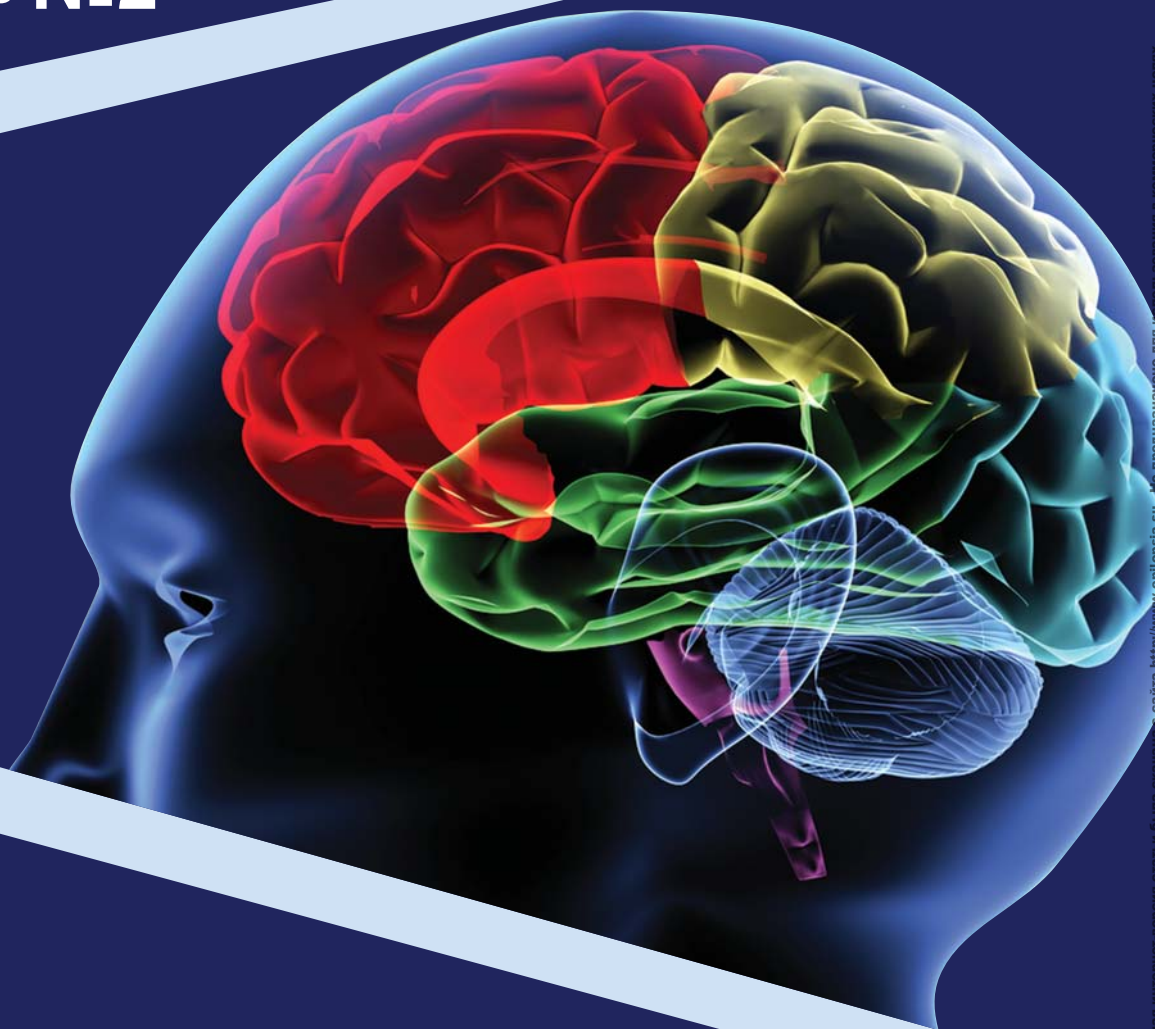


Проблемная комиссия «Эпилепсия. Пароксизмальные состояния» РАМН
и Министерства здравоохранения Российской Федерации

Российская Противозепилептическая Лига

ЭПИЛЕПСИЯ и пароксизмальные состояния

2013 Том 5 №2



Включен в перечень ведущих
рецензируемых журналов
и изданий ВАК

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЛЕКАРСТВЕННОМ МОНИТОРИНГЕ

Абаимов Д.А., Сариев А.К., Носкова Т.Ю., Шведков В.В.,
Ширяева М.В., Стырова Е.Ю., Прохоров Д.И., Сейфулла Р.Д.

ФГБУ «Научный центр неврологии» РАН, Москва

Резюме: в связи с появлением новых технологий в фармакокинетике, фармакогенетике и аналитической химии современная медицина выходит на качественно новый этап развития. Базисом рациональной терапии в современной медицине становится терапевтический лекарственный мониторинг – способ управления и контроля эффективности фармакотерапии в реальном времени. В статье освещены различные аспекты терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ), как подраздела клинической фармакологии. Представлены основные показания к проведению ТЛМ, процедуры, применяемые при проведении ТЛМ. Обсуждено значение ТЛМ для эпилептологии. Особое внимание уделено биоаналитическим методам, применяемым в ТЛМ, и новым методическим подходам, таким, как неинвазивный лекарственный мониторинг и равновесный диализ. Отдельно освещается роль ТЛМ как самостоятельной научной дисциплины, в том числе с использованием современных фармакокинетических компьютерных программ.

Ключевые слова: терапевтический лекарственный мониторинг, противоэпилептические препараты, свободная и связанная фракции препарата, равновесный диализ, фармакогенетическое тестирование, неинвазивный ТЛМ, хроматография, масс-спектрометрия, популяционное фармакокинетическое компьютерное моделирование, межлекарственные взаимодействия.

Введение

В XXI веке медицина выходит на новый этап развития. Постгеномные технологии и развитие диагностической техники ставят новую планку в отношениях пациента и врача. Многие ученые и клиницисты наступивший XXI век совершенно закономерно считают веком рациональной лекарственной терапии. Как известно, главная цель рациональной терапии –

максимальный лечебный эффект при минимальном побочном действии. Для достижения этой цели в клинике осуществляется разнонаправленный мониторинг больных, с целью получения исчерпывающей информации об их состоянии. Такого рода информацию можно получить различными способами, которые сводятся к трем основным подходам:

1. **Клинический мониторинг.** Лечебный эффект регистрируется напрямую при осмотре больных и по результатам лабораторных анализов, при параллельной фиксации побочных эффектов.
2. **Фармакодинамический мониторинг.** Этот подход актуален при невозможности непосредственной фиксации терапевтического эффекта. Измеряются косвенные показатели, отражающие ход болезни (биомаркеры etc.). В психоневрологии для указанной цели применяется метод позитронно-эмиссионной томографии для оценки эффективности связывания лекарственного вещества с молекулярными мишенями (например, с рецепторами нейромедиаторов).
3. **Фармакокинетический мониторинг.** Способ оценки эффективности фармакотерапии, основанный на измерении концентрации лекарственного препарата в крови. В современной научно-медицинской литературе данный подход получил обозначение терапевтический лекарственный мониторинг.

Терапевтический лекарственный мониторинг (далее ТЛМ) – молодая клиническая дисциплина, которая сочетает в себе определение концентрации препарата в крови (или плазме), с применением принципов фармакокинетики и фармакодинамики для оптимизации режимов дозирования. Важно отметить, что само возникновение такой клинической дисциплины, как ТЛМ, стало возможным только благодаря развитию современных технологий, прежде всего, в области аналитической и физической химии. Предпосылкой для появления ТЛМ стала доступность аналитических процедур, которые позволяют провести количественное измерение концентрации лекарственного препарата в биологических образцах с надлежащей

надежностью и точностью в сочетании с приемлимыми затратами и стоимостью. Кроме того, современные методы обеспечили необходимую экспрессность – результаты исследований стало возможным получить за 24-часовой период времени после отбора крови. Поскольку концентрации препаратов, применяемых в неврологии, довольно низки, аналитические методы должны быть селективными, высокочувствительными и должны отвечать требованиям, обеспечивающим точное и надежное количественное измерение концентрации вещества. Методы хроматографического разделения, такие как газовая и жидкостная хроматография (ГХ и ВЭЖХ), в сочетании с адекватными способами детекции наиболее селективны и чувствительны. Эти техники могут быть адаптированы для анализа значительного числа препаратов. Далее мы подробнее остановимся на перечисленных методах, с точки зрения адекватности их применения в области ТЛМ.

ТЛМ: в каких случаях он нужен?

Ключевым понятием, на котором базируется методология ТЛМ, является понятие терапевтического коридора. Терапевтический коридор – диапазон концентраций лекарственного вещества, в пределах которого вещество реализует положительный фармакологический эффект. При концентрационных значениях ниже границ терапевтического коридора вещество не оказывает положительного клинического эффекта, а превышение верхней границы данного диапазона приводит к токсическим эффектам. В настоящее время оправданность применения такого жесткого термина, как коридор терапевтических концентраций, активно дискутируется, поскольку с развитием технологий индивидуализации лекарственной терапии стало понятно, что у некоторых пациентов положительный эффект может быть достигнут при концентрации лекарственного вещества, находящегося ниже терапевтического коридора, в то же время у других пациентов положительный эффект достигается при концентрационном уровне, превосходящем верхние пределы терапевтического коридора. Поэтому в настоящее время есть большое число сторонников применения рабочего термина «рекомендуемый диапазон концентраций» [3]. ТЛМ наиболее актуален в случае применения лекарственных средств с узким терапевтическим коридором, когда зона положительного эффекта находится достаточно близко от зоны токсических эффектов (т.е. для веществ с низким терапевтическим индексом). Также важным показанием к применению методов ТЛМ в отношении препарата является высокий уровень корреляции между концентрацией препарата в плазме и терапевтическим эффектом от лекарства. Также ТЛМ может быть полезен в следующих случаях:

- при первом визите к врачу для получения информации об установившемся стационарном уровне лекарственного препарата в крови;

- для выяснения причин недостаточной эффективности фармакотерапии;
- для предотвращения либо подтверждения токсических эффектов;
- при политерапии для оценки влияния лекарственных взаимодействий;
- для оценки комплаентности пациента (приверженности лечению);
- для оптимизации индивидуального режима дозирования;
- при значительной межиндивидуальной вариативности фармакокинетических параметров лекарственного препарата;
- при нелинейной кинетике препарата (при отсутствии прямой взаимосвязи между дозой лекарственного препарата и его концентрацией в крови);
- при отсутствии аутентичных клинических маркеров фармакологического эффекта;
- в случае применения лекарственных препаратов в группах пациентов с потенциальной фармакокинетической изменчивостью (возрастные пациенты, пациенты с сопутствующими заболеваниями, дети, беременные женщины).

Перечисленные выше показания к проведению терапевтического лекарственного мониторинга схематически представлены на рисунке №1.

В неврологии терапевтический лекарственный мониторинг нашел применение в области оптимизации и коррекции фармакотерапии эпилепсии. Действительно, есть много причин, по которым антиконвульсантная терапия нуждается в ТЛМ-сопровождении. Во-первых, это обусловлено тем, что антиконвульсанты применяются как профилактические средства, а эпилептические приступы происходят с нерегулярными временными интервалами. Зачастую трудно быстро определить, достаточна ли предписанная доза для формирования долгосрочной ремиссии. Во-вторых, признаки лекарственной интоксикации и связанные с этим симптомы при применении антиконвульсантов чаще всего имеют слабо выраженный характер и плохо дифференцируются от проявлений основной патологии. И, наконец, в-третьих, большой проблемой является отсутствие прямых лабораторных маркеров клинической эффективности антиконвульсантов. Также лабораторные маркеры отсутствуют и для проявлений интоксикации противоэпилептическими средствами, связанной с неблагоприятными эффектами со стороны центральной нервной системы. Центральным смыслом проведения ТЛМ при эпилепсии является улучшение состояния пациента, с помощью тонкой регуляции режима фармакотерапии на основе информации о концентрациях противоэпилептических препаратов (ПЭП) в сыворотке или плазме. Таким образом, ТЛМ позволяет усилить противоэпилептическое действие препаратов, минимизируя их побочные эффекты [13]. Основопологающей концепцией ТЛМ является то, что терапевтический эффект лекарствен-



Рисунок 1. Схематическое изображение основных показаний к применению терапевтического лекарственного мониторинга.

ного препарата лучше коррелирует с концентрацией лекарственного средства, чем с его дозой. Есть ряд требований, которым частично или полностью должен соответствовать лекарственный препарат, характеризующийся сильной корреляционной связью между его концентрацией в крови и фармакологическим эффектом. У лекарственного средства должно быть быстро обратимое действие, отсутствие эффекта толерантности, ассоциированного с сайтом связывания препарата. Препарат должен действовать сам по себе, а не через метаболиты, в случае наличия активных метаболитов их концентрация должна быть измерена, и концентрация лекарственного средства в физиологической жидкости, из которой производится пробоотбор (обычно кровь), должна иметь идеально высокую корреляцию с концентрацией лекарственного средства в органе-мишени. Исходя из вышесказанного ТЛМ может быть рекомендован для всех ПЭП [3]. Однако полноценность этих измерений варьирует у разных антиконвульсантов, в зависимости от их фармакологических свойств. Терапевтический лекарственный мониторинг наиболее актуален для эпилептологов в нижеперечисленных случаях:

- при впервые установленной эпилепсии (определение концентрационных значений верхней и нижней границы терапевтического коридора);
- при определении постиктального концентрационного уровня ПЭП в плазме крови;
- при выраженных побочных эффектах (определение индивидуального «терапевтического диапазона» пациента и, вместе с тем, определение «индивидуального терапевтического порога», оценка индивидуального прогноза лечения);
- сопровождение процесса отмены лекарственного

препарата (в частности, фенобарбитала). Из литературных данных известно, что во время фазы отмены могут отмечаться эпилептические приступы («приступы отмены»). Эти эпилептические припадки не имеют значения для формирования прогноза эпилепсии, однако могут свидетельствовать о неэффективности выбранной фармакотерапевтической стратегии;

- для дифференциальной диагностики хронической интоксикации;
- для определения комплаентности;
- для оптимизации режима дозирования у детей в период фазы роста или у пациентов с резко изменившимся, в силу различных причин, весом;
- при колебании стационарной концентрации ламотриджина на фоне приема оральных контрацептивов;
- при межлекарственных взаимодействиях. Это актуально как в случае комбинированной противоэпилептической терапии с сочетанным приемом различных противоэпилептических средств, так и в случае сочетания ПЭП с антипсихотиками (прежде всего с индукторами или ингибиторами микросомальных ферментов печени);
- отсутствие терапевтического эффекта или неудовлетворительный эффект при стандартной терапевтической дозе;
- выраженные побочные эффекты при стандартной терапевтической дозе препарата;
- срыв ремиссии при неизменной дозе;
- индивидуальные генетические особенности.

В настоящее время, в силу высоких экономических издержек, ТЛМ преимущественно осуществляется на базе централизованных лабораторно-диаг-

ностических центров или коммерческих лабораторий, хотя никто не отменял важность наличия лаборатории ТЛМ для медицинских противоэпилептических центров, поскольку зачастую требуется срочное проведение измерения концентрации антиконвульсантов, особенно в случае вышеперечисленных показаний [10].

Схема процесса ТЛМ: пять шагов

1-й шаг: запрос от клинициста на анализ концентрации лекарственного средства.

Существует четыре основных показания для измерения концентраций лекарственных препаратов в плазме крови:

а) необходимость убедиться в том, что препарат достигает молекулярной мишени – рецептора – в количестве, достаточном для реализации фармакологического эффекта препарата;

б) для убеждения в том, что концентрация препарата (либо его метаболита) не столь высока, чтобы вызывать симптомы интоксикации;

в) для руководства подбором дозового режима в клинических ситуациях, в которых происходит быстрое изменение фармакокинетики (неонатология, дети, пациенты с нарушением выводящей функции почек и печени);

г) для определения фармакокинетических параметров и взаимосвязи концентрация-эффект у новых препаратов.

2-й шаг: забор крови. Согласно литературным рекомендациям кровь должна быть собрана путем венопункции после достижения равновесной концентрации препарата (пять периодов полувыведения после коррекции дозировки). Существует отработанный метод взятия крови для ТЛМ под названием стратегия «пик-спад» (peak-trough). По этой схеме кровь отбирают двукратно. Первый раз кровь забирают натощак, до приема препарата, во время максимального снижения его стационарной концентрации в крови, непосредственно перед очередным введением препарата. Считается, что C_{trough} , или остаточный уровень препарата, отображает терапевтическую эффективность лекарственного средства. Второй отбор производится на концентрационном максимуме препарата – C_{peak} , который измеряют, как правило, спустя 2-3 ч после перорального введения, примерно через 1 ч после внутримышечной инъекции и через 30 мин после внутривенного введения препарата. Считается, что по концентрации препарата C_{peak} можно судить о токсических эффектах препарата [2].

3-й шаг: количественный анализ концентрации лекарственного средства в лаборатории.

4-й шаг: интерпретация полученных результатов.

5-й шаг: оптимизация лечения на основе информации о текущем состоянии пациента и полученных концентрационных значениях.

Согласно литературным рекомендациям кровь должна быть собрана в состоянии стационарной

фармакокинетики (пять периодов полувыведения после коррекции дозировки), натощак, до приема препарата, во время максимального снижения его стационарной концентрации в крови. В сопроводительном бланке запроса, поступающем вместе с образцом плазмы крови, необходимо указывать диагноз, пол, возраст, дозировку, продолжительность лечения, сопутствующую фармакотерапию и причину запроса. Такая подробная информация необходима для того, чтобы избежать аналитических проблем в лаборатории. В том случае, если требуется экспертная интерпретация концентрационных значений лекарственного средства, необходимо полностью приводить всю имеющуюся информацию относительно «контекста». Такой подход позволит извлечь максимальную клиническую пользу от применения ТЛМ. Отчет лаборатории может включать рекомендации по дозированию и другие комментарии. У лаборатории, однако, имеется довольно ограниченная информация относительно общей клинической ситуации. Поэтому ответственным за продолжение лечения, корректировку дозы или отмену препарата является только лечащий врач пациента, который в своем решении должен опираться, в том числе, на результаты ТЛМ и рекомендации экспертной группы.

Методы количественного анализа лекарственных веществ, применяемые в ТЛМ

Несмотря на то что существует большое число методов определения концентраций лекарственных веществ в биологических жидкостях, в терапевтическом лекарственном мониторинге применяются только два основных подхода: это иммунологические (иммуоферментные) и хроматографические методы анализа. Иммуоферментные методы показали свою высокую эффективность для рутинных анализов наиболее известных противоэпилептических средств. Однако они имеют ряд ограничений. Прежде всего, иммуоферментные методы привязывают аналитика к определенному производителю тестовых наборов. Кроме того, недостатком этого подхода является то, что иммуоферментные методы разработаны для очень узкой линейки лекарственных препаратов. Также эти методы могут давать большие погрешности в измерениях, в случае перекрестной аффинности антител по отношению к метаболиту препарата (иммунологический тест показывает большее значение по сравнению с реальным уровнем препарата). Совокупность этих ограничений делает невозможным применение иммунологических подходов для научно-исследовательских задач, оставляя их в арсенале коммерческих тестовых лабораторий [14].

Наибольшее распространение в ТЛМ-лабораториях получили хроматографические методы анализа лекарств. К преимуществам указанных методов относятся высокая чувствительность определения, универсальность, экспрессность, возможность парал-



Рисунок 2. Типичное рабочее место в хроматографической лаборатории, оборудованной для проведения терапевтического лекарственного мониторинга.

лельного определения нескольких лекарственных препаратов в одной пробе и относительная дешевизна анализа одной биологической пробы. Несмотря на то что применение хроматографических методов сопряжено с закупкой дорогостоящего оборудования, для обслуживания которого требуется привлечение высококвалифицированных специалистов, в конечном итоге эти затраты быстро окупаются при проведении массовых анализов. Типичный внешний вид хроматографической лаборатории, оборудованной для проведения терапевтического лекарственного мониторинга, представлен на рисунке 2.

Все хроматографические методы основаны на принципе разделения сложных смесей химических веществ на различных сорбентах (неподвижных фазах), относительно которых вещество движется в потоке носителя – подвижной фазы. Каждое вещество

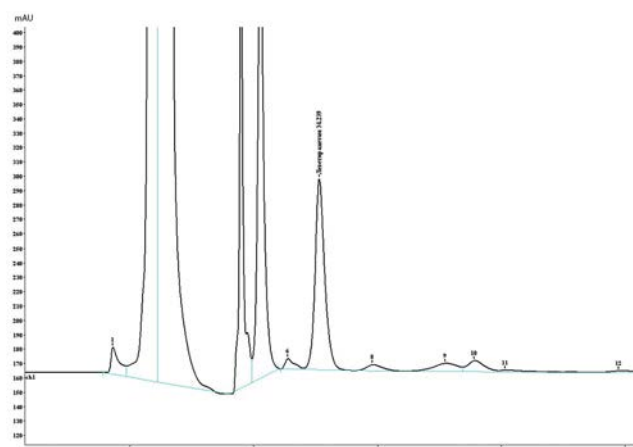


Рисунок 3. Хроматограмма леветирацетама. Образец плазмы крови пациента с концентрацией леветирацетама в плазме крови 34,3 мкг/мл. По оси абсцисс – время (t) в минутах, по оси ординат – светопоглощение в единицах оптической плотности * 10⁻³ (milli Absorbance Unit, mAU).

обладает уникальными сорбционными свойствами. Различия в сорбционных способностях химических веществ лежат в основе хроматографического разделения [7].

Высокоэффективная жидкостная хроматография в ТЛМ. В настоящее время наиболее широкое распространение в терапевтическом лекарственном мониторинге получил метод высокоэффективной обращенно-фазной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием в УФ-диапазоне. Количественное определение препарата в данном методе производится по интенсивности поглощения вещества на определенной длине волны в УФ-спектре. Действительно, данный метод позволяет изучать довольно широкую линейку препаратов. Несмотря на это, метод имеет ряд ограничений. Так, известно, что многие вещества демонстрируют неудовлетворительный уровень светопоглощения в УФ-диапазоне. Кроме того, коэффициент светопоглощения в УФ-спектре сильно зависит от pH раствора. Необходимо отметить влияние сопутствующих биологических веществ, которые также могут поглощать ультрафиолет и хроматографически интерферировать с анализируемыми лекарственными веществами, затрудняя количественный, а иногда и качественный анализ. В этой связи приходится разрабатывать сложные методы пробоподготовки для того, чтобы успешнее очистить и изолировать анализируемый препарат. Лишь в отдельных случаях, когда вещества содержатся в плазме крови в высоких концентрациях (выше 1 мкг/мл), возможно применение упрощенных методов пробоподготовки. Наиболее экспрессным способом является метод депротеинизации плазмы крови органическими растворителями, например, ацетонитрилом или метанолом. В лаборатории клинической фармакокинетики ФГБУ «НЦН» РАМН метод ВЭЖХ-УФ успешно применяется для количественного анализа таких веществ, как карбамазепин, ламотриджин и леветирацетам. Хроматограмма образца плазмы крови пациента, принимающего леветирацетам, представлена на рисунке 3.

Газовая хроматография в ТЛМ. Данный метод имеет ряд существенных ограничений. Так, вещества, определяемые на газовом хроматографе должны сочетать ряд качеств, таких как термостабильность, отсутствие полярных группировок в молекуле, относительная летучесть. Кроме того, газовая хроматография очень чувствительна к биологическим загрязняющим веществам. Такие биологические матрицы, как плазма и сыворотка крови, содержат ряд примесей (насыщенные липиды, стеринны, жирные кислоты), которые оказывают негативное воздействие на продолжительность жизни расходных материалов для газовой хроматографии (прежде всего капиллярных колонок). Помимо матричных эффектов, к ограничениям указанного метода следует отнести повышенные требования к внутреннему стандарту. Для преодоления перечисленных ограничений

используется метод дериватизации – анализируемое вещество подвергается химическим превращениям, реагируя с известным дериватирующим агентом, в результате чего оно приобретает новые свойства, необходимые для его хроматографирования (летучесть, неполярность, термостабильность). Однако сам по себе метод дериватизации требует закупки дериватирующих агентов. Зачастую это довольно ядовитые и дорогостоящие вещества. Кроме того, проведение реакции дериватизации требует дополнительного времени, увеличивая и без того времязатратный период пробоподготовки. В настоящее время газовая хроматография в терапевтическом лекарственном мониторинге применяется довольно редко и избирательно. Наиболее часто газовую хроматографию применяют для определения лекарственных веществ в моче, которая лишена всех недостатков, присущих плазме крови и сыворотке. В лаборатории клинической фармакокинетики метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием применяется для анализа концентрационных уровней вальпроевой кислоты и эпоксида карбамазепина (см. рис. 4).

Жидкостная хромато-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС). Наиболее современным методом аналитического определения лекарственных веществ является жидкостная хромато-масс-спектрометрия, которая совмещает все преимущества жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Ее появление стало возможным благодаря изобретению способа ионизации, называемого методом электроспрея – щадящего метода ионизации, когда вещества, поступающие с хроматографа, в растворе превращаются в аэрозоль, в котором вещества, находящиеся в микрокаплях подкисленного раствора, протонируются под действием электрического поля высокого напряжения. К преимуществам данного метода относятся:

1. Универсальность – метод ВЭЖХ-МС позволяет работать с веществами, относящимися к различным химическим группам. Метод дает возможность определения липофильных и гидрофильных, полярных и неполярных, летучих и нелетучих, низкомолекулярных и высокомолекулярных веществ. Это позволяет определять в одной пробе одновременно сразу несколько веществ, в т.ч. веществ разной природы. Это особенно актуально в случае изучения противоэpileптических препаратов, среди которых есть как бензодиазепиновые производные и трициклические соединения, так и жирные кислоты и олигопептиды;
2. Селективность – вещество определяется по двум характеристическим параметрам: времени удерживания и индивидуальному «ионному портрету» вещества;
3. Высокая чувствительность – метод ВЭЖХ-МС позволяет определять количества вещества на несколько порядков меньшие, чем классические хроматографические методы, вплоть до аттограмм;
4. Минимизация влияний биологической матрицы:

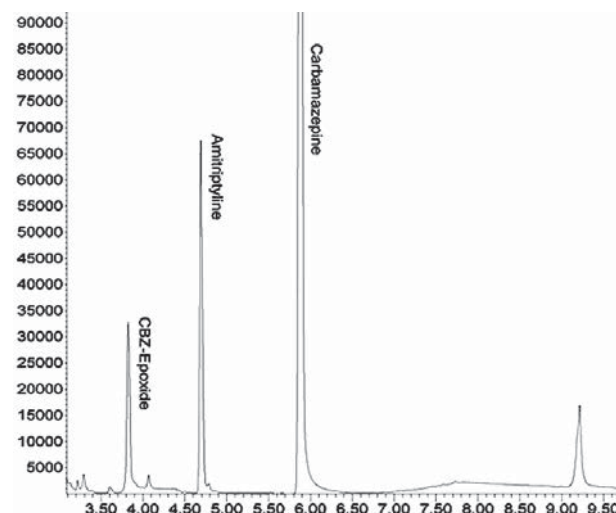


Рисунок 4. Масс-хроматограмма эпоксида карбамазепина. По оси абсцисс – время (t) в минутах, по оси ординат – отклик масс-спектрометра в условных единицах интегрирования. Также на хроматограмме виден пик неизмененного карбамазепина и внутреннего стандарта – амитриптилина.

коэкстрактивные вещества фактически игнорируются хроматомасс-спектрометром и не мешают определению целевых лекарственных веществ, в то время как в прочих хроматографических методах приходится прибегать к сложным и времязатратным методам пробоподготовки.

Все это в совокупности делает указанный метод наиболее актуальным для работы в области ТЛМ. Первоначально методы ВЭЖХ-МС в основном использовались для исследовательских целей, поскольку стоимость оборудования была слишком высока, а персонал для работы в области хромато-масс-спектрометрии должен был иметь очень высокую профессиональную квалификацию, и это в целом не позволяло применять метод для рутинных

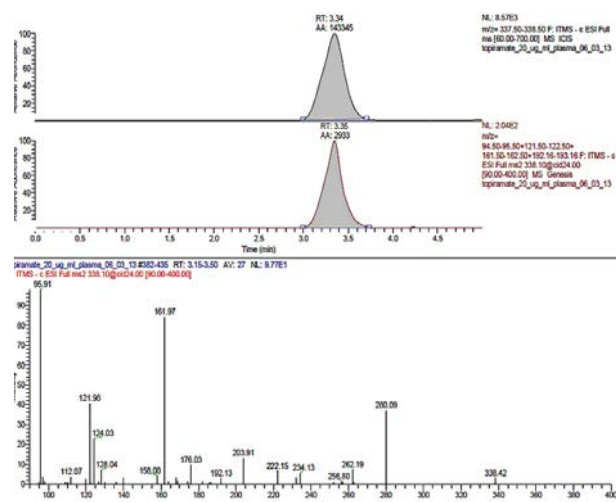


Рисунок 5. Масс-хроматограмма топирамата, концентрация препарата в плазме крови 20 мкг/мл.

задач ТЛМ. Однако к настоящему времени хромато-масс-спектрометрическое оборудование становится все более доступным для широкого количества лабораторий, поскольку произошло значительное снижение стоимости оборудования, а работа с ним значительно упростилась благодаря современным компьютерным технологиям [8]. Метод ВЭЖХ-МС применяется нами преимущественно для количественного определения таких противоэпилептических препаратов, как топирамат и габапентин. Демонстрационная масс-хроматограмма топирамата представлена на рисунке 5.

Неинвазивные подходы в ТЛМ

Определение концентраций лекарственных веществ в слюне для контроля безопасности и эффективности противоэпилептических средств является актуальной альтернативой определению концентрации лекарственного средства в сыворотке и плазме крови. Концентрации ПЭП первого поколения в слюне демонстрируют высокий уровень корреляции с концентрацией этих препаратов в сыворотке и плазме крови. Противоэпилептические препараты второго и третьего поколения также определяются в слюне и также показывают статистически достоверную корреляцию с концентрациями в крови. Сбор образцов слюны имеет безболезненный и атравматичный характер. В этой связи пробоотбор может осуществлять даже неподготовленный персонал. Несложность пробоотбора слюны предполагает несколько преимуществ. Во-первых, пробоотбор можно выполнять на дому, а образец можно отправлять по почте в клиническую лабораторию или клинику. Такой метод пробоотбора способен сэкономить финансовые потери пациентов, связанные с отсутствием на рабочем месте и затратами на проезд в лабораторию или клинику, что особенно актуально для пациентов, которые живут в сельских районах с ограниченным доступом к услугам здравоохранения. Во-вторых, кон-

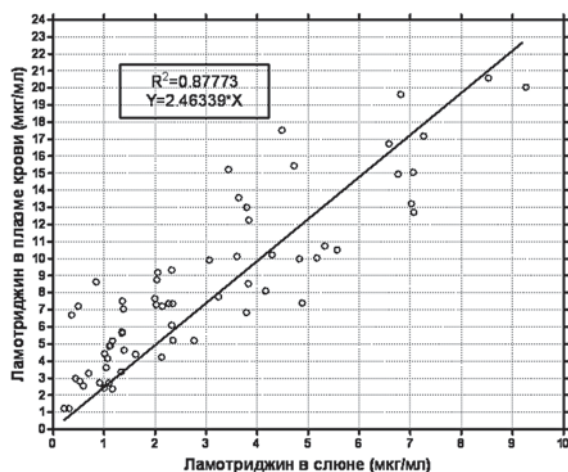


Рисунок 6. Графическое изображение линейной регрессии, отражающей степень корреляции концентраций ламотриджина в слюне и в плазме крови.

центрации лекарственных препаратов в слюне можно определять в образцах, собранных сразу же после припадка или в период, предшествующий эпилептическому приступу, что таким образом позволяет изучать концентрацию противоэпилептического средства в режиме реального времени и может помочь в оценке эффективности и безопасности изучаемого лекарственного средства. В третьих, определение концентраций препаратов в слюне с целью проведения ТЛМ может уменьшить общие затраты здравоохранения, поскольку при проведении ТЛМ по слюне не требуется привлекать флеботомиста и применять специализированную гематологическую тару [17]. Наконец, концентрации лекарственного вещества в слюне количественно характеризуют уровень несвязанной с белками фракции ЛС в плазме крови (поскольку вещества в связанном виде не способны попадать через стенки клеток из кровяного русла в слюну). Это особенно важно для веществ, имеющих высокий коэффициент связывания с белками плазмы крови. Наиболее высоким коэффициентом связывания с белками плазмы среди противоэпилептических препаратов обладает препарат карбамазепин (75%). В лаборатории клинической фармакокинетики ФГБУ «НЦН» РАМН в 2008 г. было проведено исследование фармакокинетики карбамазепина в слюне на здоровых добровольцах. Было обнаружено, что в слюне концентрация карбамазепина составляет 30% от таковой для плазмы крови. Концентрация карбамазепина в слюне была довольно высокой и составляла 0,893 по критерию Пирсона [4]. Ряд других противоэпилептических препаратов также способны связываться с альбуминами. Например, ламотриджин связывается с белками плазмы крови на 55%. Поэтому представляло значительный интерес изучить соотношение между концентрациями ламотриджина в плазме крови и слюне. В результате сравнительного изучения содержания ламотриджина в плазме крови и слюне, которое было проведено в лаборатории клинической фармакокинетики ФГБУ «НЦН» РАМН, нами было показано, что концентрации вещества в плазме крови в среднем составляют 41% от концентрации ламотриджина в слюне. Был рассчитан предиктор – коэффициент экстраполяции, который составил 2,46339, т.е. концентрацию в плазме крови можно рассчитать по формуле $C_{пл} = 2,46339 \cdot C_{сл}$. Коэффициент корреляции составил $R^2 = 0,8777$ при уровне значимости $P < 0,0001$ (по критерию Пирсона), что говорит о высокой прогностической значимости полученных данных. Таким образом, нами обнаружено, что, во-первых, значения корреляции концентраций ламотриджина в слюне и плазме крови в целом достаточно высоки, что делает перспективным применение слюны в качестве биологического субстрата для ТЛМ (см. рис. 6). Во-вторых, мы продемонстрировали, что концентрация ламотриджина в слюне (41%) близка к концентрации свободного препарата (45%) [16]. Однако гораздо бо-

более достоверные результаты относительно свободной фракции ЛС можно получить только специализированными методами, прежде всего — методом равновесного диализа.

Определение свободной фракции препарата

Как известно, среди лекарственных препаратов немало веществ, транспортерами которых являются белки плазмы крови. Эти вещества могут связываться с белками с различной степенью аффинности. Интенсивность связывания лекарственных средств с белками плазмы крови может быть низкой, средней или высокой (80%). Некоторые препараты, такие как антиконвульсант этосуксимид и нормотимик литий в принципе не связываются с белками плазмы крови (связывание — 0%). Основными белками-переносчиками лекарственных средств в крови являются альбумины и липопротеины (прежде всего сывороточный альбумин). В связи с этим препарат находится в плазме крови в двух основных состояниях: в виде свободной и связанной с белками фракций, распределение между которыми детерминировано принципом обратимого равновесия и законом действующих масс. Известно, что только свободное лекарственное средство способно давать фармакологический эффект, поскольку только свободное вещество может пересекать клеточную цитоплазматическую мембрану и связываться с рецепторами [2]. Кроме того, важно отметить, что только свободное, не связанное с белками вещество, способно пересекать гематоэнцефалический барьер. Это особенно актуально для препаратов, мишенью которых является центральная нервная система. Известно, что высокий процент связывания с белками плазмы крови демонстрирует антиконвульсант карбамазепин. Более того, содержание альбумина в плазме крови может оказывать выраженное влияние на реализацию побочных и токсических эффектов карбамазепина. Известно, что такие патологические состояния как уремия, заболевания печени и гипоальбуминемия могут привести к значительным увеличениям уровня свободной фракции лекарственных средств, что зачастую приводит к токсическим эффектам лекарственного средства, даже если суммарная концентрация всего лекарственного средства находится в пределах терапевтического диапазона. Лекарственные взаимодействия могут также приводить к непропорциональному увеличению концентрации несвязанного с белками лекарственного средства. У возрастных пациентов также нередко наблюдается увеличение свободной фракции лекарственных веществ, что возможно связано с гипоальбуминемией. Есть данные об увеличении концентрации свободной фракции фенитоина у больных СПИДом и беременных женщин [11]. Также характер и интенсивность связывания лекарственных веществ с сывороточным альбумином может вносить значительный вклад в процессы межлекарственного взаимодействия. Из-

вестно, что вещества способны конкурировать за сайты связывания на молекуле альбумина. Вещества, обладающие высокой степенью связывания с альбуминами, могут вытеснять другие вещества с сайтов связывания на молекуле белка, что, в свою очередь, может приводить к изменению эффекта лекарственных соединений и зачастую — к увеличению вероятности развития нежелательных реакций [1]. В настоящее время все большее количество клинических лабораторий изучают свободные концентрации таких антиконвульсантов, как фенитоин, карбамазепин и вальпроовая кислота. Для измерения свободной фракции лекарственных препаратов применяется метод равновесного диализа — плазма крови уравнивается с изотоническим буферным раствором, отделенным полупроницаемой мембраной, пропускающей низкомолекулярные соединения и не пропускающей высокомолекулярные биополимеры (белки, липиды, полисахариды). Метод в настоящее время технологизирован, наборы для равновесного диализа выпускаются различными фирмами. В качестве примера можно привести наборы фирмы Pierce — Rapid Equilibrium Dialysis (RED) и фирмы HTDialysis, LLC — Reusable 96-well Micro-Equilibrium Dialysis Device HTD, которые в настоящее время производятся в США (см. рис. 7).

Таким образом, наиболее перспективными для изучения свободной фракции являются такие антиконвульсанты, как карбамазепин (связывание с белками 80%), вальпроовая кислота (90%), ламотриджин (55%), окскарбазепин и его метаболит 10-гидроксикарбазепин (60 и 40%, соответственно) [11].

Фармакогенетическое тестирование как вспомогательный инструмент терапевтического лекарственного мониторинга

Измеренные в рамках ТЛМ концентрационные значения лекарственных веществ и их метаболитов в плазме крови являются производными от генетиче-



Рисунок 7. Современное лабораторное оснащение, применяемое для изучения параметров связывания лекарственного препарата с белками плазмы крови.

ских факторов и факторов внешней среды, влияющих на абсорбцию, распределение, метаболизм и экскрецию препаратов. Также влияние оказывают такие факторы, как комедикация, нарушение функционирования выделительной системы, обусловленное, например, старением либо сопутствующими заболеваниями, курение, рацион и режим питания.

Наиболее изучены генетические факторы, связанные с мутациями и полиморфизмом генов цитохрома 450, – ферментативной системы, отвечающей в организме за утилизацию ксенобиотиков, в т.ч. и за катаболизм лекарственных препаратов. В последнее время пристальное внимание исследователей привлекают различные транспортные системы организма, в частности, активно исследуется роль Р-гликопротеинов, которые влияют на проникновение лекарственных препаратов в кровяное русло через стенки кишечника и участвуют в переносе веществ через гематоэнцефалический барьер. Показано, что Р-гликопротеинам свойственно высокое генетическое разнообразие, в частности, число полиморфизмов среди генов Р-гликопротеинов соизмеримо с таковым для цитохромов Р 450 [3].

Большинство лекарственных препаратов, применяемых в неврологии, утилизируются посредством биотрансформации, преимущественно цитохромами, эпоксидазой либо ферментативными системами конъюгации (уридилдифосфоглюкуронозилтрансферазой, УГТ). В настоящее время вклад молекулярно-генетического разнообразия УГТ в межиндивидуальную метаболическую вариативность биотрансформации нейротропных препаратов остается не вполне выясненным. В то же время, знание фармакогенетики нейротропных средств, связанной с полиморфизмами цитохрома Р 450, уже приносит большую пользу в подборе и оптимизации фармакотерапии.

В современной научной литературе существует ряд публикаций, в которых описывается значение фармакогенетического тестирования для успешного проведения нейрофармакотерапии, также авторами предложены рекомендации по дозированию лекарственных средств в зависимости от генотипа. Среди больных выделяют ряд подгрупп, в зависимости от скорости метаболизма: медленные метаболизаторы (с генетически обусловленной недостаточностью ферментативной активности), промежуточные метаболизаторы, быстрые метаболизаторы, ультрабыстрые метаболизаторы (с генной мультипликацией – увеличением дозы гена цитохрома Р 450) [12].

К сожалению, фармакогенетическое тестирование как метод имеет существенные ограничения и оно само по себе не способно дать исчерпывающую информацию о фармакокинетике лекарственного препарата. Фармакогенетическое тестирование также не способно спрогнозировать уровень вещества в крови пациента. Это связано с различными факторами. Так, например, даже в пределах одного генотипа ферментативная активность может серьезно варьировать и претерпевать

довольно резкие изменения. Кроме того, лекарственные вещества могут быть субстратами сразу нескольких энзимов, деятельность которых зависит от дозы препарата. Если же лекарственное вещество имеет активные метаболиты, то при оценке фармакологического эффекта лекарственного препарата должна учитываться и концентрация метаболитов [10].

Ввиду этих и других факторов фармакогенетическое тестирование применяется только как вспомогательное исследование по отношению к ТЛМ, например, как вспомогательный диагностический метод для интерпретации резко выходящих за нормальный терапевтический диапазон концентраций препарата в крови. В то же время, к плюсам генетического тестирования следует отнести то, что его результаты имеют пожизненную силу.

Терапевтический лекарственный мониторинг для науки

Долгое время ТЛМ рассматривался как вспомогательная клиническая процедура, не имеющая самостоятельного научного значения. И, несмотря на то что лаборатории терапевтического лекарственного мониторинга по всему миру накапливали огромный фактический материал относительно соотношения режима дозирования и соответствующих концентраций лекарственного вещества у огромного количества пациентов, эти данные по преимуществу оставались «молчащими» для науки, поскольку ограниченное число измерений создавало значительные математические трудности для интерпретации полученных результатов. Однако интерес фармакологов к результатам ТЛМ постоянно возрастал. Это было связано с тем, что результаты ТЛМ гораздо в большей степени отражают реальные характеристики изучаемой популяции и межиндивидуальную вариабельность реакций различных пациентов на получаемые разные схемы дозирования лекарственных препаратов. Настоящим прорывом стало применение для интерпретации данных, полученных в результате проведения ТЛМ, нового подхода, который получил название популяционного моделирования [15]. Этот метод стал широко применяться благодаря компьютеризации и применению специализированных компьютерных программ, которые позволяют использовать данные ТЛМ для оценки фармакокинетических параметров различных препаратов и их сочетаний при политерапии. В основе работы данных программ лежат математические методы, преимущественно базирующиеся на байесовском подходе. Особенностью байесовского подхода является принцип максимального использования имеющейся в наличии априорной информации (в нашем случае это сумма данных популяционной фармакокинетики), ее непрерывного пересмотра и переоценки с учетом получаемых выборочных данных об исследуемом явлении или процессе (в нашем случае – данные о концентрации препарата в крови пациента). К числу этих фармакокинети-

ческих приложений относятся такие программы, как NONMEM, NPML, MONOLIX, NPEM и целый ряд других, менее популярных фармакокинетических программных пакетов [6]. Вкратце хотелось бы остановиться на возможностях данных программ и их актуальности в клинической фармакологии. Специализированные программные пакеты для интерпретации данных ТЛМ позволяют:

1. Обрабатывать данные ТЛМ, содержащие только одно измерение концентрации препарата у пациента;
2. Выделять подпопуляции пациентов, отличающиеся быстрым и медленным метаболизмом препарата;
3. Определять индивидуальные фармакокинетические характеристики пациента в отношении выбранного препарата;
4. Прогнозировать концентрацию препарата в крови конкретного пациента в зависимости от выбранной дозы;
5. Формировать рекомендации по коррекции лекарственной терапии.

К преимуществам указанных программ следует отнести и то, что они могут выполнять роль «передаточного звена» от биоаналитической лаборатории к клиницисту. В лаборатории клинической фармакокинетики ФГБУ «НЦН» РАМН совместно с учеными-клиницистами научно-консультативного отделения успешно эксплуатируется компьютерная программа MM-USCPACK, разработанная сотрудниками лаборатории LAPK (Laboratory of applied pharmacokinetic of the Keck School of Medicine at the University of Southern California, USA). Принцип, положенный в основу работы данной программы – статистический метод NPEM (nonparametric expectation maximisation), непараметрический метод максимизации вероятности. Этот метод использует байесовский подход, итеративно строит непрерывную совместную плотность распределения фармакокинетических параметров, наилучшим образом описывающую результаты измерений, не предполагает конкретную форму распределения кинетических параметров, позволяет выделить подпопуляции пациентов (например, отличающиеся быстрым и медленным метаболизмом препарата), а также, что особенно важно, может работать с данными, содержащими по одному измерению концентрации препарата. В настоящее время с помощью вышеуказанной компьютерной программы можно производить расчеты фармакокинетических характеристик на основании данных ТЛМ для трех препаратов, применяемых в неврологической практике: карбамазепина, вальпроевой кислоты и габапентина. Причем для карбамазепина в рамках программы MM-USCPACK возможен расчет фармакокинетических характеристик, в т.ч. и на фоне его взаимодействия с такими препаратами, как фенobarбитал и фенитоин [9]. В программе MM-USCPACK индивидуализация больных производится по таким параметрам, как константа абсорбции (характеризует скорость всасыва-

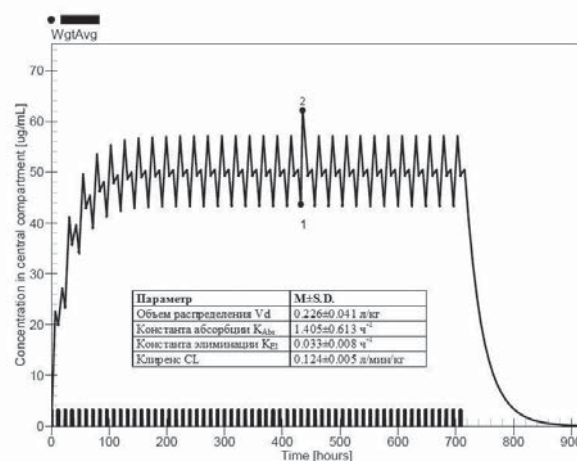


Рисунок 8. Индивидуальная фармакокинетическая кривая пациента с рассчитанными фармакокинетическими характеристиками в отношении вальпроевой кислоты.

ния препарата из ЖКТ в кровяное русло), константа элиминации препарата (характеризует индивидуальную скорость метаболизма лекарственного вещества), объем распределения лекарственного вещества и его клиренс (см. рис. 8). К важным преимуществам программы MM-USCPACK следует отнести имеющуюся у данной программы возможность по данным популяционной фармакокинетики, индивидуальных антропометрических данных пациента, а также по результатам одного-двух измерений концентрации препарата в плазме крови определять индивидуальные фармакокинетические характеристики пациента в отношении выбранного препарата, прогнозировать концентрацию препарата в крови конкретного пациента в зависимости от выбранной дозы и, в конечном итоге, формировать рекомендации по коррекции лекарственной терапии. С помощью MM-USCPACK успешно производится коррекция дозировки вальпроевой кислоты и карбамазепина у амбулаторных больных эпилепсией, получающих медицинскую помощь в научно-консультативном отделении ФГБУ «НЦН» РАМН [5]. В настоящее время популяционное моделирование с применением специализированных компьютерных программ становится самостоятельным видом фармакокинетических исследований. Указанные программы не только применяются для определения фармакокинетических параметров лекарственных препаратов на основе модельного подхода и используются в клинике для индивидуализации дозирования, но также помогают в изучении фармакокинетического взаимодействия препаратов при политерапии.

Заключение

Подведя краткий итог всему вышесказанному, можно сделать вывод о том, что на наших глазах происходит превращение терапевтического лекарствен-

ного мониторинга из вспомогательной процедуры в самостоятельную научно-исследовательскую дисциплину в рамках клинической фармакологии. Фармакокинетические исследования лекарственных препаратов, как правило, проводятся на стадии клинических регистрационных исследований, а после регистрации и по истечении патентной охраны препарата интерес в фармакологических исследованиях у фирмы-производителя существенно ослабевает. Однако информация о фармакокинетике препарата, полученная в процессе регистрационных исследований, не является исчерпывающей. Например, исследования на предмет межлекарственных взаимодействий проводятся лишь для узко ограниченного числа препаратов. Кроме того, фармакокинетические исследования по известным причинам не могут проводиться в определенных группах пациентов (например, на беременных женщинах и маленьких детях).

Таким образом, основную научную значимость представляет информация, которую ТЛМ дает относительно:

- межлекарственных взаимодействий;
- влияния возраста, веса, пола на фармакокинетические характеристики отдельных препаратов;
- фармакокинетических эффектов различных состояний, характерных для определенных групп пациентов (у пациентов с определенными заболеваниями, у беременных женщин и т.д.);
- индивидуальных отклонений фармакокинетических параметров (фармакогенетический аспект).

В свете всего вышесказанного можно с уверенностью констатировать, что с дальнейшим развитием биоаналитических и компьютерных технологий вклад ТЛМ в фармакологическую науку будет расти все более впечатляющими темпами.

Литература:

1. Белоусов Ю.Б., Гуревич К.Г. Клиническая фармакокинетика. Практика дозирования веществ. М. 2005.
2. Мирошниченко И.И. Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств. М. 2011.
3. Носкова Т.Ю. Возможности оптимизации фармакотерапии эпилепсии. Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2009; 3: 37-40.
4. Родионов А.А., Кабанова И.А., Сейфулла Р.Д., Тимофеев А.Б. Терапевтический лекарственный мониторинг при эпилепсии: альтернативные подходы. Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2008; 2: 14-19.
5. Сариев А.К., Носкова Т.Ю., Абаймов Д.А., Суслина З.А. Новые методы в оптимизации фармакотерапии эпилепсии: опыт внедрения байесовского фармакокинетического моделирования. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2012; 4: 40-47.
6. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях 2-е изд., перераб. и доп. М. 2006.
7. Соколов А.В. Терапевтический лекарственный мониторинг. Качественная клиническая практика. 2002: 78-88.
8. Adaway J.E., Keevil B.G. Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2012; 883-884: 33-49.
9. Bondareva I.B., Sokolov A.V., Tischenkova I.F. et al. Population pharmacokinetic modelling of carbamazepine by using the iterative Bayesian (IT2B) and the nonparametric EM (NPEM) algorithms: implications for dosage. J Clin. Pharm. Ther. 2001; 26: 213-223.
10. Brandt C., Baumann P., Eckermann G. et al. Therapeutic drug monitoring in epileptology and psychiatry. Nervenarzt. 2008; 79: 167-174.
11. Dasgupta A. Usefulness of monitoring free (unbound) concentrations of therapeutic drugs in patient management. Clin. Chim. Acta. 2007; 377: 1-13.
12. Gervasini G., Benitez J., Carrillo J.A. Pharmacogenetic testing and therapeutic drug monitoring are complementary tools for optimal individualization of drug therapy. Eur. J. Clin. Pharmacol. 66: 755-774.
13. Hallworth M. Wl. Therapeutic drug monitoring and laboratory medicine. London: ACB Venture Publications, 2008.
14. Hiemke C. Therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: does it hold its promises? Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci. 2008; 258 Suppl 1: 21-27.
15. Jelliffe R.W., Schumitzky A., Bayard D. et al. Model-based, goal-oriented, individualised drug therapy. Linkage of population modelling, new 'multiple model' dosage design, bayesian feedback and individualised target goals. Clin Pharmacokinet. 1998; 34: 57-77.
16. Johanssen S.I., Landmark C.J. Antiepileptic drug interactions – principles and clinical implications. Curr. Neuropharmacol. 2010; 8: 254-267.
17. Jones M.D., Ryan M., Miles M.V. et al. Stability of salivary concentrations of the newer antiepileptic drugs in the postal system. Ther. Drug. Monit. 2005; 27: 576-579.

MODERN TECHNOLOGIES IN THERAPEUTIC DRUG MONITORING (REVIEW)

Abaimov D.A., Sariev A.K., Noskova T.Yu., Shvedkov V.V., Shiryayeva M.V., Styrova E.Yu., Prokhorov D.I., Seyfulla R.D.

FGBU «Scientific Center of Neurology», RAS Moscow

Abstract: due to the emergence of new technologies in a pharmacokinetics, a pharmacogenetics and analytical chemistry, the medicine comes to qualitatively new stage of development. Therapeutic drug monitoring as the mean of the real time pharmacotherapy efficiency control becomes the basis of rational therapy in modern medicine. In the article various aspects of the therapeutic drug monitoring (TDM) as subsection of clinical pharmacology are discussed. The main indications to carrying out TDM and the main TDM procedures are submitted. Value of TDM for an epileptology is discussed. The special attention is paid to the bioanalytical methods and new methodical approaches (such as non-invasive drug monitoring and equilibrium dialysis) applied in TDM. TDM role as an independent discipline of a medical sciences, with concentration on modern pharmacokinetics computer programs is separately analyzed.

Key words: therapeutic drug monitoring, antiepileptic drug, free and bound fractions of a preparation, equilibrium dialysis, pharmacogenetics testing, non-invasive TDM, chromatography, mass spectrometry, population pharmacokinetic computer modeling, drug-drug interactions.