

ных странах мира (в среднем от 0% до 8%), но для большей ясности картины в дальнейшем изучении требуется более широкая выборка исследуемых лиц. Низкая распространенность аллели позволяет предположить, что проявление осложненных реакций к абакавиру при применении данного препарата и его производных в схемах лечения обследованных ВИЧ-инфицированных в Винницком регионе Украины не будет вызвана фактором наличия аллели HLA-B*5701. Результаты данного исследования могут быть полезны для дальнейших исследований по этому и аналогичным вопросам на Украине.

ХРОМАТО – МАСС–СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕСС–МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИРЕТРОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ПЛАЗМЕ/ СЫВОРОТКЕ КРОВИ ВИЧ–ИНФИЦИРОВАННЫХ

**Черепкова О.А., Зацепин Т.С., Дедков В.Г., Маркелов М.Н.,
Красницкая И.А., Шипулин Г.А.**

*ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва,
Россия*

Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) – определение концентрации лекарственного вещества и его метаболитов в плазме крови или других биологических жидкостях организма. ТЛМ необходим для контроля проводимой лекарственной терапии с тем, чтобы концентрация лекарственного вещества не превысила минимальной токсической и не была ниже минимальной терапевтической. Лекарственный мониторинг при назначении некоторых препаратов необходим также потому, что их токсические концентрации ненамного превышают терапевтические, то есть имеют узкий терапевтический коридор. Для минимизации ятрогенного действия препаратов установлены предельно допустимые дозы, величины которых получены в расчете на среднестатистического взрослого здорового человека. Однако такой подход является достаточно грубым, т. к. не учитывает индивидуальных особенностей метаболизма конкретного пациента. На фармакокинетику и фармакодинамику лекарственных веществ существенное влияние могут оказывать генетически обусловленные особенности ферментного комплекса, ответственного за их трансформацию, наличие различных сопутствующих заболеваний, прием прочих лекарственных препаратов, особенности пищевого статуса и пр. В случае усиленного выведения из организма лекарственного

препарата, его концентрация в крови не достигает терапевтической дозы, и, как результат, не наблюдается ожидаемого лечебного действия. Обратная ситуация возникает в случае аккумуляции препарата, что приводит к усилению токсического воздействия на организм пациента. Для определения концентраций лекарственных веществ в настоящее время используются следующие методы:

- хроматографические,
- микробиологические,
- спектрофотометрические,
- полярографические,
- иммунологические (радиоиммунные, иммуноферментные),
- радиоизотопные.

Названные методы хорошо описаны в мировой литературе и широко применяются при проведении ТЛМ. Каждый метод обладает определенными достоинствами и недостатками.

Требования, предъявляемые к методу в нескольких словах, следующие: чувствительность определения, быстрота анализа, точность анализа, возможность работы с малым объемом биоматериала, стоимость анализа. На сегодняшний день наиболее перспективным для анализа лекарственных веществ в различных биологических жидкостях представляется использование различных хроматографических методов. Распространение этих методик тормозится высокой стоимостью хроматографического оборудования. Однако высокая пропускная способность и низкая стоимость одного анализа позволяют быстро окупить затраты при поточном использовании.

ТЛМ антиретровирусных препаратов (АРП) в настоящее время играет важную роль в клинической диагностике. Высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ) – метод терапии ВИЧ инфекции человека состоящий в приёме одновременно трёх и более препаратов в противоположность монотерапии (1 препарат), применявшейся ранее. Рациональный выбор ВААРТ – сложный процесс, в ходе которого врач должен не только учитывать данные по сравнительной эффективности и безопасности препаратов, но и принимать в расчет потенциальные лекарственные взаимодействия, предполагаемую приверженность пациента к тем или иным режимам терапии, наличие сопутствующих заболеваний. Отличительной чертой всех антиретровирусных препаратов является высокая токсичность. Препараты данной группы оказывают токсическое воздействие на печень, почки, поджелудочную железу и др., что может приводить к гепатитам, нарушениям обмена веществ, нарушению гемопоэза, острым панкреатитам, почечной недостаточности, аллергическим реакциям, нарушениям работы периферической нервной системы, диспептическим рас-

стройствам и пр. Терапия ВИЧ-инфицированных также осложняется еще и одновременным применением комбинации препаратов из трех различных групп: нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ), нунуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ) и ингибиторы протеазы ВИЧ (ИП). Поэтому целью ВААРТ является подбор схемы лечения и дозировок препаратов таким образом, чтобы при минимальном токсическом воздействии обеспечить терапевтический эффект.

Индивидуальный подбор дозировки лекарственных препаратов позволяет максимально точно адаптировать лечебную тактику к особенностям каждого пациента. Однако, при подборе адекватной схемы терапии врач вынужден, зачастую, действовать эмпирически.

Целью настоящей работы является разработка методики ТЛМ антиретровирусных препаратов (АРП) ВИЧ-инфицированных больных с помощью хромато-масс-спектрометрии, которая может существенно облегчить задачу подбора ВААРТ лечащему врачу и снизить риск возможных негативных последствий терапии для пациента.

Материалы и методы. Диданозин (DDI), Ламивудин (ЗТС), Ставудин (d4T), Эфавиренц (EFV), Невирапин (NVP), Саквинавир (SQV) и Ритонавир (RTV) были закуплены Chembio; Зидовудин (ZDV), Фосфазид (pAZT), а также внутренний стандарт №1 5-йодуридин были любезно предоставлены ООО АЗТ ФАРМА К.Б.; внутренний стандарт №2 пепстатин А был закуплен у фирмы AppliChem. Растворители HPLC квалификации были закуплены у фирмы LAB-SCAN.

Agilent 1100 Series с одноквадрупольным масс-спектрометрическим детектором MSD использовался для идентификации присутствующих в крови лекарственных препаратов. Использовали аналитическую колонку Agilent 4,6 x 150 мм, 5 мкм, Zorbax SB-C18. Объем инъекции 50 мкл. Время анализа 20 минут.

Подготовку образцов плазмы/сыворотки для хромато-масс-спектрометрического анализа проводили с использованием методик высаливания белков в присутствии сульфата цинка с предварительной обработкой изопропанолом для снятия гидрофобного связывания лекарственных препаратов с белками плазмы/сыворотки.

Субстанции DDI, ЗТС, d4T, ZDV, pAZT растворяли в воде, NVP, SQV, RTV, EFV – в метаноле до конечной концентрации 2 мг/мл. Из полученных стоковых растворов готовили композитный стандарт (включающий все перечисленные субстанции), который был смешан с плазмой здоровых людей, не содержащей рассматриваемых лекарственных веществ. Конечная концентрация каждой субстанции в композитном стандарте в плазме составила 18000 нг/мл. Серийным разбавлением получили десять калибровочных растворов.

Было подобрано режим хроматографии с использованием UV-детектора. Разделение с хорошим разрешением всех девяти препаратов было достигнуто при использовании градиента ацетонитрила, содержащего 0,1 % муравьиной кислоты. При этом минимальная выявляемая в крови концентрация каждого препарата составляла 40 нг/мл. Полное время анализа, включая пробоподготовку, – 40 минут.

При использовании одноквадрупольного масс-спектрометрического детектора чувствительность метода возрастает в 40 раз. Коэффициент вариации не превышал 10%. Предварительно проведен анализ крови трех ВИЧ-инфицированных больных, которым была предложена комбинированная терапия, состоящая из трех антиретровирусных препаратов, а именно, ЗТС, d4Т и EFV. Результаты представлены в таблице.

пациент	терапия	ЗТС, мкг/мл	d4Т, мкг/мл	EFV, мкг/мл
		«коридор» 0,20–1,50, мкг/ мл	«коридор» 0,20–0,52, мкг/мл	«коридор» 0,50–2,90, мкг/мл
1	d4Т+ЗТС+EFV	0.18	0.34	0.90
2	d4Т+ЗТС+EFV	0.44	0.18	1.90
3	d4Т+ЗТС+EFV	0.23	0.11	2.27

Как видно из представленных результатов, концентрации лекарственных препаратов в крови пациентов не превышают допустимые терапевтические. Однако было обнаружено, что концентрация в крови ламивудина (ЗТС) в случае пациента № 1 и ставудина (d4Т) в случае пациентов № 2 и № 3 недостаточна для достижения лечебного эффекта.

Таким образом, предварительные данные свидетельствуют о возможности проведения ТЛМ антиретровирусных препаратов (АРП) ВИЧ-инфицированных больных с помощью хромато-масс-спектрометрии.

В настоящее время нами проводится работа по созданию и внедрению в медицинскую практику методики хромато-масс-спектрометрического анализа всего спектра АРТ, разрешенных для клинического использования в Российской Федерации.