



## ОПТИМИЗАЦИЯ МОНИТОРИНГА КОНЦЕНТРАЦИЙ ЭВЕРОЛИМУСА У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СЕРДЦА НА ФОНЕ ПАТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ

Е. И. Безвуляк<sup>1</sup>, О. С. Мельниченикова<sup>1</sup>, Т. В. Вавилова<sup>1</sup>, М. А. Симоненко<sup>2</sup>, Ю. В. Сазонова<sup>3</sup>, П. А. Федотов<sup>4</sup>  
ФГБУ «НМИЦ имени В. А. Алмазова» МЗ РФ (Санкт-Петербург, Россия)

<sup>1</sup> Кафедра лабораторной медицины и генетики

<sup>2</sup> НИЛ кардиопульмонального тестирования

<sup>3</sup> НИЛ торакальной хирургии

<sup>4</sup> НИЛ высокотехнологичных методов лечения сердечной недостаточности, к.м.н.

## OPTIMIZATION OF THE MONITORING OF CONCENTRATIONS OF EVEROLIMUS IN PATIENTS AFTER HEART TRANSPLANTATION ON THE BACKGROUND OF LIVER PATHOLOGY

E. I. Bezvulyak<sup>1</sup>, O. S. Melnichenikova<sup>1</sup>, T. V. Vavilova<sup>1</sup>, M. A. Simonenko<sup>2</sup>, Y. V. Sazonova<sup>3</sup>, P. A. Fedotov<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of clinical laboratory diagnostics and genetics

<sup>2</sup> Research laboratory of Cardiorespiratory testing

<sup>3</sup> Research laboratory of thoracic surgery

<sup>4</sup> Research laboratory of High-tech treatment

**Для цитирования:** Безвуляк Е. И., Мельниченикова О. С., Вавилова Т. В., Симоненко М. А., Сазонова Ю. В., Федотов П. А. Оптимизация мониторинга концентраций эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца на фоне патологии печени. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2018;150(2): 68–73.

**For citation:** Bezvulyak E. I., Melnichenikova O. S., Vavilova T. V., Simonenko M. A., Sazonova Y. V., Fedotov P. A. Optimization of the monitoring of concentrations of everolimus in patients after heart transplantation on the background of liver pathology. Experimental and Clinical Gastroenterology. 2018;150(2): 68–73.

### Резюме

**Цель исследования.** Оптимизировать терапевтический лекарственный мониторинг иммуносупрессивной терапии эверолимусом у пациентов после трансплантации сердца на фоне патологии печени.

#### Задачи исследования.

1. Разработать методику количественного определения концентрации эверолимуса в цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.
2. Изучить влияние нарушенной функции печени на фармакокинетику эверолимуса у пациентов с патологией печени по сравнению с пациентами с нормальной функцией печени.

**Материалы и методы исследования.** Для изучения влияния патологии печени на фармакокинетику эверолимуса, концентрацию препарата в цельной крови определяли методом ВЭЖХ–МС/МС у 16 пациентов (мужчин — 10, женщин — 6) после трансплантации сердца, наблюдавшихся в ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ в период 2016–2017 гг., в возрасте от 25 до 67 лет (средний возраст — 55,5 лет). Среднее время после трансплантации сердца 4,5 года. Пациенты получали эверолимус в дозе от 1,25 мг/сут до 5,4 мг/сут (средняя доза эверолимуса — 2,5 мг/сут). В соответствии с распределением симптомов НАЖБП больные были разделены на 2 группы (табл. 1): группа 1–4 пациента с признаками неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), группа 2 — без признаков НАЖБП.

#### Выводы

1. Предложенная методика, реализуемая с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, является простой, воспроизводимой, быстрой и надежной для определения эверолимуса в цельной крови человека с целью фармакокинетических исследований.
2. Неалкогольная жировая болезнь печени у пациентов после трансплантации сердца, получающих в схеме иммуносупрессивной терапии ингибитор mTOR эверолимус, значительно влияет на фармакокинетику препарата, достижение целевых значений, что может ухудшать прогноз заболевания и качество жизни.

## Summary

**Purpose of research.** To optimize therapeutic drug monitoring of immunosuppressive therapy with everolimus in patients after heart transplantation on the background of liver pathology.

### Research problem.

1. To develop a method for quantifying the concentration of everolimus in human whole blood by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection.
2. To study the effect of impaired liver function on the pharmacokinetics of everolimus in patients with liver pathology in comparison with patients with normal liver function.

**Materials and methods of research.** To study the effect of liver pathology on the pharmacokinetics of everolimus, the concentration of the drug in whole blood was determined by HPLC–MS/MS in 16 patients (men — 10, women — 6) after heart transplantation, observed in the fgbi “NMITS im. V.A. Almazova” of the Ministry of health of the Russian Federation in the period 2016–2017, aged from 25 to 67 years (average age — 55.5 years). The average time after heart transplantation is 4.5 years. Patients received everolimus at a dose of 1.25 mg / day to 5.4 mg/day (average dose of everolimus — 2.5 mg / day). In accordance with the distribution of nafr symptoms, the patients were divided into 2 groups (table.1): 1–4 patients with signs of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), group 2 without evidence of NAFLD.

### Conclusion

1. The proposed method implemented using the method of high performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry is straightforward, reproducible, rapid and reliable for the determination of everolimus in human whole blood with the aim of pharmacokinetic studies.
2. Non-alcoholic fatty liver disease in patients after heart transplantation, receiving immunosuppressive therapy inhibitor mTOR everolimus, significantly affects the pharmacokinetics of the drug, achieving the target values, which can worsen the disease prognosis and quality of life.

## Актуальность проблемы

Патология печени может изменять фармакокинетику и фармакодинамику лекарственных средств (ЛС), подвергающихся биотрансформации в печени (Кобалава Ж. Д., 2010). Кроме того, ряд заболеваний печени и печеночная недостаточность повышают вероятность развития нежелательных лекарственных реакций.

К препаратам, преимущественно метаболизирующимся в печени, относится пероральный иммуносупрессант эверолимус. Эверолимус является ингибитором мишени рапамицина млекопитающих (mTOR). TOR (target of rapamycin) – серин – треониновая киназа, которая участвует в регуляции клеточного роста (интегрирует сигналы от ростовых факторов, питательных веществ и уровня энергии), синтеза белка, метаболизма, пролиферации и дифференцировки. Препарат связывается с иммунофилином FKBP – 12, образуя комплекс, который оказывает ингибирующее действие. Основным эффектом ингибирования mTOR является снижение чувствительности иммунокомпетентных клеток к влиянию интерлейкина-2. Пациенты, перенесшие трансплантацию органов, нуждаются в пожизненном приеме иммуносупрессивной терапии, схема которой включает в себя ингибиторы mTOR. В настоящее время эверолимус активно применяется у пациентов с трансплантацией почки [9]. В России эверолимус с 2016 г. вошел в схемы иммуносупрессивной терапии у пациентов после трансплантации сердца [2]. Согласно данным Международного регистра общества трансплантаций сердца и легких (ISHLT), ежегодно в мире выполняется более 3800 трансплантаций сердца. В России также наблюдается ежегодный прирост пересадок

сердца. Схемы иммуносупрессивной терапии и методы ее контроля продолжают совершенствоваться.

По литературным и клиническим данным наиболее часто регистрируемыми нежелательными явлениями терапии эверолимусом стали проявления гематологической и общей токсичности, осложнения со стороны кожи и слизистых оболочек, а также респираторные нарушения [5]. Кроме того, при определенных клинических условиях, возможно появление лихорадки, астении, пневмонии, проявления респираторной токсичности (пневмонит, кашель, одышка), легочного и желудочно-кишечного кровотечения, повышение толерантности к глюкозе, ишемии миокарда, тромбофлебита, артериальной гипертензии, диспепсических явлений, угнетение кроветворения.

Узкий терапевтический диапазон, значительная межиндивидуальная вариация фармакокинетических параметров лекарственного средства, поли-терапия пациентов после трансплантации сердца является показанием к включению эверолимуса в группу препаратов с обязательным лекарственным мониторингом. Терапевтический интервал концентраций окончательно не определен. Приблизительные целевые значения эверолимуса при применении их в составе иммуносупрессивных протоколов у реципиентов трансплантатов сердца составляет от 3 до 8 нг/мл для хроматографического метода [10].

Кроме вышеуказанных факторов, на достижение терапевтического диапазона концентраций, влияют наличие патологии печени. В исследовании, посвященном влиянию нарушенной функции печени на фармакокинетику, переносимость и безопасность

применения эверолимуса (Халилулин Т. Р., Москва, 2012), показано, что у пациентов с легкой, умеренной и тяжелой печеночной недостаточностью по сравнению с группой с нормальной функцией печени, экспозиция (площадь под кинетической кривой) эверолимуса увеличивается на 160%, 324% и 362%, соответственно, а общий клиренс эверолимуса снижается на 38%, 69% и 72%.

В настоящее время в практике российских лабораторий эверолимус определяется в основном иммунохимическим методом, что обусловлено относительной простотой использования, быстротой анализа, небольшой стоимостью исходных материальных затрат на приобретение оборудования. Чувствительность иммунохимического метода в целом отвечает требованиям клинической практики [11]. Однако, признанным золотым стандартом для проведения терапевтического лекарственного

мониторинга является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС), основанный на хроматографическом разделении компонентов смеси с дальнейшим детектированием исследуемого соединения по специфичным ионам-маркерам в масс-спектре. ВЭЖХ-МС/МС демонстрирует высокую точность и сходимость результатов, обеспечивает низкие пределы количественного обнаружения, делает стоимость единичного исследования низкой. Кроме того, метод ВЭЖХ-МС/МС отличается высокой специфичностью и позволяет исключить кросс-реактивность метаболитов [11].

**Цель исследования:** оптимизировать терапевтический лекарственный мониторинг иммуносупрессивной терапии эверолимусом у пациентов после трансплантации сердца на фоне патологии печени.

### Задачи исследования

1. Разработать методику количественного определения концентрации эверолимуса в цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.
2. Изучить влияние нарушенной функции печени на фармакокинетику эверолимуса у пациентов с патологией печени по сравнению с пациентами с нормальной функцией печени.

### Материалы и методы исследования

Для изучения влияния патологии печени на фармакокинетику эверолимуса, концентрацию препарата в цельной крови определяли методом ВЭЖХ-МС/МС у 16 пациентов (мужчин – 10, женщин – 6) после трансплантации сердца, наблюдавшихся в ФГБУ “НМИЦ им. В. А. Алмазова” МЗ РФ в период 2016–2017 гг., в возрасте от 25 до 67 лет (средний возраст – 55,5 лет). Среднее время после трансплантации сердца 4,5 года. Пациенты получали эверолимус в дозе от 1,25 мг/сут до 5,4 мг/сут (средняя доза эверолимуса – 2,5 мг/сут.). В соответствии с распределением симптомов НАЖБП больные были разделены на 2 группы (табл. 1): группа 1–4 пациента с признаками неалкогольной

жировой болезни печени (НАЖБП), группа 2 – без признаков НАЖБП (12 чел.).

Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью программы Graphpad Prism 6, используя тест Манна – Уитни для сравнения двух независимых групп данных, не подчиняющихся нормальному закону распределения. Результаты представлены в виде среднего значения эверолимуса и стандартного отклонения, коэффициента вариации и доли значений эверолимуса, превышающих верхний диапазон терапевтического интервала у больных после пересадки сердца в зависимости от наличия НАЖБП.

Таблица 1.

Характеристика пациентов, учитывающая симптомы, характерные для НАЖБП.

**Примечание:**

Д/Л – дислипидемия, СД – сахарный диабет 2 типа, АС – атеросклероз, ВГ – вирусный гепатит, МС – Метаболический синдром, П – подагра, ЖКБ – желчно-каменная болезнь, А – астения.

Группы	Пациент	ДЛ	СД	АС	ВГ	МС	П	ЖКБ	А
Группа 1	Больной А.	+		+	+			+	
	Больной Б.	+	+	+					+
	Больной В.	+		+					+
	Больной Г.			+		+	+	+	+
Группа 2	Больной Д.			+				+	
	Больной Е.								
	Больной Ж.	+		+					
	Больной З.								
	Больной И.			+					+
	Больной К.			+					
	Больной Л.							+	
	Больной М.			+	+				
	Больной Н.	+		+					
	Больной О.	+		+					
	Больной П.								
	Больной Р.								

## Результаты и обсуждения

Измерение концентрации эверолимуса было выполнено в 348 образцах цельной крови, забранных в утренние часы перед приемом следующей дозы (в среднем 21 измерение на одного больного).

Концентрацию эверолимуса определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, разработанной и валидированной в лаборатории жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии ФГБУ "НМИЦ имени В. А. Алмазова" МЗ РФ (Санкт-Петербург).

Подготовка пробы заключалась в предварительном осаждении сульфатом цинка белков и солей в присутствии метанола. Супернатант инжектировался в хроматограф, и компоненты пробы разделялись на колонке с обращенной фазой C 18 в режиме изократического элюирования. В качестве подвижных фаз использованы 100 мМ раствор формиата аммония в воде и метаноле, содержащем 0.1% муравьиной кислоты. Для идентификации пика эверолимуса на масс-хроматограмме (рис. 1) и подтверждения его гомогенности использовали

спектральные отношения и сочетание высокоэффективного жидкостного хроматографа "LC1260 Infinity" и масс-спектрометрического детектора "TripleQuard 6460" с системой ионизации "Agilent Jet Stream-электроспрей" (Agilent, США). Концентрацию определяли по площади под кривой пика (рис. 1) с использованием линейной зависимости для эверолимуса в диапазоне от 1–15 нг/мл (рис. 2)

Детектирование проводилось в режиме мониторинга заданных реакций (табл. 2).

Таким образом, разработана и внедрена в клиническую и лабораторную практику методика количественного определения эверолимуса в цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием с удовлетворительными лабораторными характеристиками. Чувствительность метода составила 0.3 нг/мл, нижний предел количественного обнаружения – 1 нг/мл. Контроль селективности метода и точности признаны удовлетворительными, согласно руководству по валидации метода. Методика была апробирована

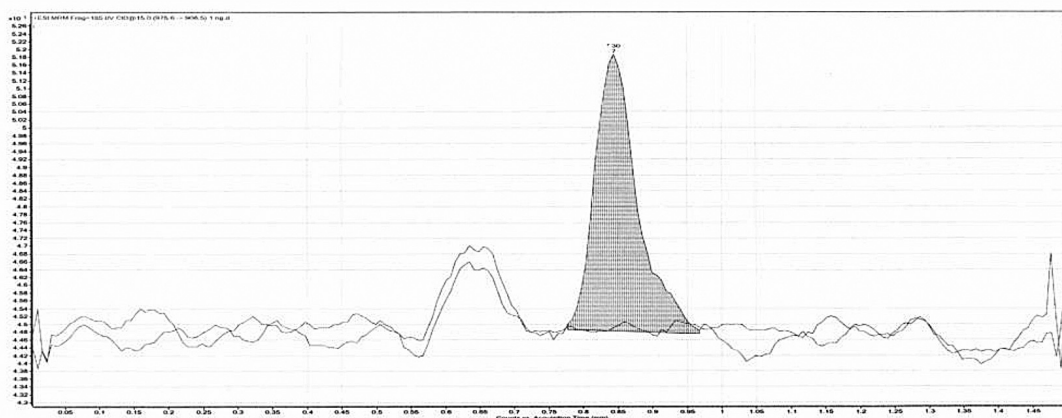


Рисунок 1.

Хроматограммы, полученные при анализе интактной крови и интактной крови с добавлением стандартного образца эверолимуса в концентрации, соответствующей нижнему пределу обнаружения.

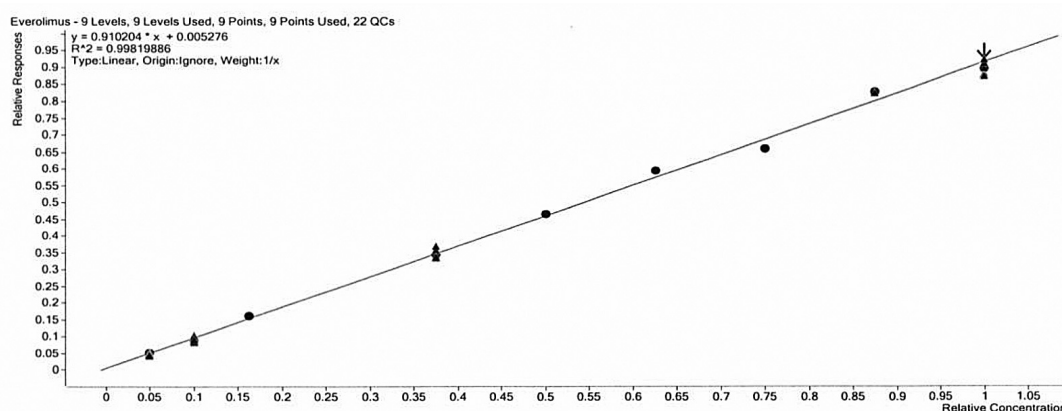


Рисунок 2.

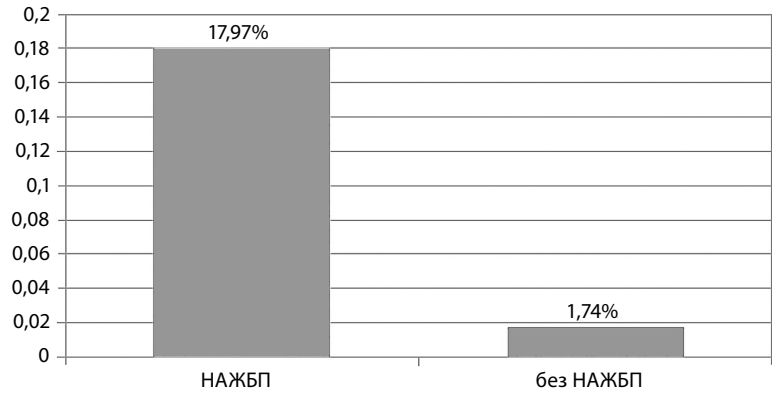
Калибровочная зависимость для эверолимуса в диапазоне концентраций от 1 нг/мл до 15 нг/мл.

Фармсубстанция	Ион – прекурсор	Ион – фрагмент	Напряжение на фрагменторе, V	Энергия соударений, V
Эверолимус	975,6	908,5	185	15
Внутренний стандарт	979,6	912,5	170	12

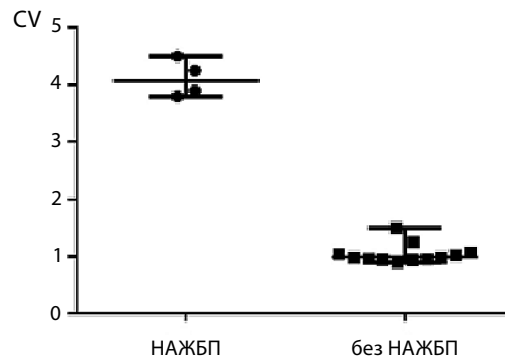
Таблица 2.

Параметры сканирования ионов

**Рисунок 3.**  
Доля значений эверолимуса, превышающих верхний предел терапевтического интервала, у больных после пересадки сердца в зависимости от наличия НАЖБП.



**Рисунок 4.**  
Коэффициент вариации результатов измерения эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца в зависимости от наличия НАЖБП.



для коррекции схемы лечения при проведении иммуносупрессивной терапии у пациентов после трансплантации сердца.

В результате проведенного исследования было выявлено, что в группе у пациентов без патологии печени и группы больных с предполагаемой неалкогольной жировой болезнью печени, среднее значение концентраций эверолимуса в двух группах составило 3,95 нг/мл.

Превышение концентрации верхней границы терапевтического интервала в 1 группе отмечено в 17,97% случаев, а в 2 группе – 1,74% случаев, что существенно ниже (рис. 3). При этом, значительный разброс был также зафиксирован во 2 группе (рис. 4),  $p = 0,0055$ .

На основании полученных данных, пациентам, перенесшим трансплантацию сердца и получающим пероральный ингибитор пролиферативного сигнала эверолимус, рекомендуется проводить оценку состояния и функции печени с целью раннего выявления и корректировки НАЖБП, что улучшит прогноз и течение основного заболевания, а также снизит риски побочных эффектов иммуносупрессивной терапии. Кроме того, необходимость контроля за состоянием печени у пациентов, перенесших трансплантацию сердца определяется тем, что неалкогольная жировая болезнь печени в рамках метаболического синдрома в настоящее

время рассматривается как независимый фактор риска развития и прогрессирования заболеваний сердечно-сосудистой системы (рекомендации для терапевтов, 2-я версия). Также, обсуждается гипотеза о том, что одним из путей развития атеросклероза является первоначальное отложение липидов в стенке желчного пузыря с развитием его холестероза на фоне нарушения обмена холестерина в гепатоците и последующим инициированием отложения липидов в стенке сосудов. В свою очередь, сердечная недостаточность, приведшая пациентов к трансплантации сердца, также способствовала развитию морфологических и функциональных изменений в печени. В последние годы опубликовано большое количество научных работ, свидетельствующих о том, что у больных НАЖБП наблюдается высокая частота обнаружения не только традиционных факторов риска ССЗ (ожирение, сахарный диабет 2 типа, МС), но и так называемых “замещающих” маркеров, которые являются предикторами высокого риска развития сердечно – сосудистой патологии у больных с НАЖБП: эндотелиальная дисфункция, повышение С-реактивного белка, изменение жесткости сосудов, увеличение толщины перикардального жира, структурно-функциональные нарушения сердца, удлинение интервала QT (рекомендации для терапевтов, 2-я версия).

## Выводы

1. Предложенная методика, реализуемая с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, является простой, воспроизводимой, быстрой и надежной для определения эверолимуса в цельной крови человека с целью фармакокинетических исследований.
2. Неалкогольная жировая болезнь печени у пациентов после трансплантации сердца, получающих в схеме иммуносупрессивной терапии ингибитор mTOR эверолимус, значительно влияет на фармакокинетику препарата, достижение целевых значений, что может ухудшать прогноз заболевания и качество жизни.

## Литература

1. Халилулин Т.Р., Гармаш И.В., Малая И.П. Клинико-фармакологические исследования у пациентов с нарушенной функцией печени. // Клиническая фармакология и терапия. – 2012. – Т. 21 – № 2. – С. 30–33.
2. Общероссийская общественная организация трансплантологов «Российское трансплантологическое общество». Национальные клинические рекомендации «Трансплантация сердца». // www.transpl.ru – 2016 г.
3. Лазебник Л.Б., Радченко В.Г., Голованова Е.В., Селиверстов П.В. и др. Неалкогольная жировая болезнь печени: клиника, диагностика, лечение (рекомендации для терапевтов, 2-я версия). // www.nogr.org – 2016 г.
4. С.Г. Зубова, Ж.В. Шитикова, Т.В. Поспелова. TOR – центрическая концепция регуляции митогенных, метаболических и энергетических сигнальных путей в клетке. // Цитология. – 2012. – Т. 54 – № 8.
5. М.И. Волкова, Д.А. Носов, В.А. Черняев и др. Эффективность и безопасность эверолимуса у больных распространенным почечно – клеточным раком (результаты российского многоцентрового наблюдательного исследования). // Онкоурология. – 2016. – Т. 12 – С. 18–27.
6. А.Н. Есауленко. Терапевтический лекарственный мониторинг. // Клинико – лабораторный консилдум. – 2008. – Т. 3 – № 22 – С. 6–10.
7. Hallvard Holdaas, Paolo De Simone, Andreas Zuckermann. Everolimus and Malignancy after Solid Organ Transplantation: A Clinical Update. // Journal of Transplantation. – 2016. – 2016:4369574, 11 pages.
8. Jerome Dumortier, Sebastian Dharancy, Yvon Calmus. Use of everolimus in liver transplantation: The French experience. // Transplantation Reviews – 2016. – Т. 30 – С. 161–170.
9. О.Н. Резник, А.Н. Ананьев, И.В. Ульянкина. Раннее назначение эверолимуса при трансплантации почек от доноров с расширенными критериями. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. 12 – С. 19–26.
10. Клинические рекомендации: лекарственный мониторинг и взаимозаменяемость оригинальных и генерических иммунодепрессантов с узким терапевтическим индексом. // www.transpl.ru – 2014 г.
11. Н.В. Апанасенко, П.В. Кудан, Ф.С. Баранова, В.Ю., В.Ю. Абрамов. Определение концентрации циклоспорина А в крови методом жидкостной хромато-масс – спектрометрии. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 6 – С. 10–13.

## Reference

1. Khalilulin TR, Garmash IV, Malaya IP, 2012. Clinico-pharmacological studies in patients with impaired liver function. Journal of Clinical pharmacology and therapy, 21 (2): 30–33.
2. All-Russian public organization of transplantologists, "Russian Transplant Society", 2012. National clinical recommendations "Heart transplantation". www.transpl.ru.
3. Lazebnik LB, Radchenko VG, Golovanova EV, Seliverstov PV and others, 2012. Non-alcoholic fatty liver disease: a clinic, diagnosis, treatment (recommendations for therapists, 2nd version). www.nogr.org.
4. S. G. Zubova, J. V. Shitikova, T. V. Pospelov, 2012. TOR – the centric concept of regulation of mitogenic, metabolic and energy signaling pathways in a cell. Cytology, 54 (8).
5. M.I. Volkova, D.A. Nosov, V.A. Chernyaev et al., 2016. Efficacy and safety of everolimus in patients with advanced renal cell carcinoma (the results of a Russian multicenter observational study). Oncurology, 12: 18–27.
6. A. N. Esaulenko, 2008. Therapeutic drug monitoring. Clinical and laboratory consultation, 3 (22): 6–10.
7. Hallvard Holdaas, Paolo De Simone, Andreas Zuckermann, 2016. Everolimus and Malignancy after Solid Organ Transplantation: A Clinical Update. Journal of Transplantation: 4369574, 11 pages.
8. Jerome Dumortier, Sebastian Dharancy, Yvon Calmus, 2016. Use of everolimus in liver transplantation: The French experience. Transplantation Reviews, 30: 161–170.
9. O.N. Reznik, A. N. Ananiev, I. V. Ulyankin, 2010. Early appointment of everolimus for kidney transplantation from donors with extended criteria. Bulletin of transplantology and artificial organs, 12: 19–26.
10. Clinical recommendations: drug monitoring and interchangeability of original and generic immunosuppressants with a narrow therapeutic index, 2014. www.transpl.ru.
11. N. V. Apanasenko, P. V. Kudan, F. S. Baranova, V. Yu., V. Yu. Abramov, 2013. Determination of the concentration of cyclosporin A in the blood by liquid chromatography mass spectrometry. // Clinical laboratory diagnostics, 6: 10–13.