

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Волгоградский государственный медицинский
университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Аникеев Иван Сергеевич

**Оптимизация технологий терапевтического лекарственного
мониторинга с использованием метода «высушенной капли»**

3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Петров Владимир Иванович

Научный консультант:

доктор биологических наук

Смирнова Людмила Андреевна

г. Волгоград – 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Терапевтический лекарственный мониторинг.....	12
1.2 Фенотипирование	16
1.3 Методы и стратегии, используемые при терапевтическом лекарственном мониторинге	19
1.4 Сложности терапевтического лекарственного мониторинга.....	22
1.5 Общие положения метода “высушенной капли”	24
1.6 Преимущества и недостатки метода высушенной капли	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	29
2.1 Основное оборудование и реактивы, используемые в исследованиях	32
2.2 Валидация методик.....	36
2.3 Статистические методы и анализ данных	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	41
3.1 Разработка ВЭЖХ-МС/МС метода количественного определения ивабрадина.....	44
3.2 Валидация ивабрадина в плазме крови	48
3.3 Валидация ивабрадина в образцах «высушенной капли крови»	51
3.4. Разработка ВЭЖХ-МС/МС метода количественного определения ванкомицина.....	58
3.5 Валидация ванкомицина в плазме крови	62
3.6 Валидация ванкомицина в образцах «высушенной капли крови»	64
3.7 Разработка ВЭЖХ-МС/МС метода количественного определения пиперациллина	69
3.8 Валидация пиперациллина в плазме крови.....	71
3.9 Валидация пиперациллина в образцах «высушенной капли крови».....	73
3.10 Разработка и валидация ВЭЖХ-МС/МС метода количественного определения эверолимуса	77
3.11 Валидация эверолимуса в плазме крови	80
3.12 Валидация эверолимуса в образцах «высушенной капли крови»	82
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	86

ВЫВОДЫ	91
Практические рекомендации	94
Список использованных сокращений.....	95
Список литературы.....	97

Введение

Актуальность проблемы

Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) является важным инструментом повышения эффективности и безопасности фармакотерапии за счёт проведения индивидуализированного подбора и выбора оптимальных режимов дозирования лекарственных препаратов на основании изучения профиля концентраций действующих веществ и/или их метаболитов в различных биологических матрицах пациентов [5].

Список лекарственных веществ регламентируется приказом министерства здравоохранения российской федерации от 2 ноября 2012 г. N 575н об утверждении порядка оказания медицинской помощи по профилю "клиническая фармакология" подлежащих мониторингу в России, содержит около 50 наименований. Особое внимание заслуживает обеспечение эффективности и безопасности использования противоопухолевых препаратов и антибиотиков, что обусловлено рядом причин: серьезные побочные эффекты, тяжелое состояние пациентов, широкий спектр сопутствующей терапии, отсутствие адекватных временных ресурсов для подбора оптимальных дозировок. Широкое использование препаратов данных групп в ряде случаев не приводит к ожидаемому эффекту терапии, что может быть связано с индивидуальными особенностями фармакокинетики препаратов [18].

Проведение терапевтического лекарственного мониторинга, как правило, связано с использованием сыворотки крови либо плазмы в качестве биологического материала для количественного определения изучаемого лекарственного препарата и/или его метаболита. Основой для получения данных биоматриц выступает цельная кровь, взятая у пациента путём стандартной венепункции. Однако во многих ситуациях данный способ

взятия проб не является оптимальным либо невыполним в принципе, что существенно ограничивает возможности оптимизации фармакотерапии с использованием ТЛМ в реальной клинической практике [195].

В связи с этим в последние годы всё большее внимание уделяется разработке более удобных и менее инвазивных технологий получения биоматериала, одним из которых является метод «высушенной капли крови» (Dried blood spot, DBS) [200].

Данный метод основан на получении минимальных количеств капиллярной крови путём пальцевого прокола с последующим нанесением капли крови на маркированную область специальной бумаги, на которой полученная капля высыхает, после чего образец может быть транспортирован в лаборатории. На этапе его подготовки к анализу фиксированный по площади участок бумаги с каплей крови вырезается, помещается в растворитель определённого состава для экстракции веществ, которые впоследствии количественно определяются с помощью различных биоаналитических технологий, наиболее востребованной из которых является хромато-масс-спектрометрия [56, 138].

Однако используемые в настоящее время требования к валидации биоаналитических методик, которые описаны в руководствах для традиционных матриц, не обеспечивают всех необходимых аспектов разработки метода аналитической и клинической валидации анализов DBS для ТЛМ. Различные специфические характеристики, такие как: влияние гематокрита, гомогенность капли и её размер, тип бумаги для DBS и/или её производитель, могут повлиять на получаемый результат и требуют дополнительной валидации [16].

В связи с этим, на сегодняшний день стоит необходимость в разработке соответствующих аналитических методик новой технологии для успешного проведения ТЛМ как одного из возможных путей повышения эффективности и безопасности его применения [16].

Степень разработанности темы

В последние годы для устранения ограничений при проведении ТЛМ и изучения различных лекарственных препаратов всё большее внимание уделяется разработке более удобных и менее инвазивных технологий получения биоматериала, одним из которых является метод «высушенной капли» (DBS, dried blood spot), обладающий рядом объективных преимуществ, перед стандартными способами пробоподготовки [2].

Мониторинг на основе DBS может быть более экономически эффективным подходом, не только позволяющим проводить лечение с учетом потребностей пациента, но и применяться для проверки соблюдения пациентом режима дозирования [3]

Однако используемые в настоящее время требования к валидации биоаналитических методик, которые описаны в руководствах для традиционных матриц, не обеспечивают всех необходимых аспектов разработки метода, аналитической и клинической валидации анализов DBS для ТЛМ [40]. Различные специфические характеристики, такие как: влияние гематокрита, гомогенность капли и её размер, тип бумаги для DBS и/или её производитель могут повлиять на получаемый результат и требуют дополнительной валидации [50].

Цель работы

Разработка высокочувствительных методик количественного хромато-масс-спектрометрического анализа лекарственных препаратов и оптимизация протоколов взятия, хранения и анализа биологических образцов при проведении терапевтического лекарственного мониторинга с использованием метода «высушенной капли».

Задачи работы

1) разработать и валидировать методы количественного ВЭЖХ-МС/МС определения лекарственных препаратов: эверолимус, ванкомицин, пиперациллин, ивабрадин в плазме крови с использованием стандартных методов пробоподготовки (преципитации белков и др.);

2) провести оптимизацию параметров количественного ВЭЖХ-МС/МС определения данных лекарственных препаратов, обладающих узким терапевтическим диапазоном, в цельной крови с использованием технологии «высушенной капли»;

3) проанализировать влияние характеристик биологических матриц на валидационные параметры методов количественного определения лекарственных препаратов с использованием различных типов пробоподготовки;

4) разработать и оптимизировать протоколы взятия, хранения и анализа биологических образцов, обеспечивающие достижение приемлемых валидационных характеристик методов количественного ВЭЖХ-МС/МС определения выбранных лекарственных препаратов с целью последующего проведения фенотипирования и терапевтического лекарственного мониторинга с использованием метода «высушенной капли крови».

Научная новизна исследования

Впервые разработан метод количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ивабрадина с использованием «высушенной капли крови» в качестве пробоподготовки с целью последующего фенотипирования СYP3A4 с использованием «ивабрадинового теста» для проведения мониторинга изменения активности данного изофермента у пациентов, получающих его индуктор либо ингибитор в составе плановой фармакотерапии.

Впервые разработаны и валидированы методы количественного ВЭЖХ-МС/МС определения лекарственных препаратов с узким терапевтическим диапазоном: эверолимуса, ванкомицина, пиперациллина, используя инновационную методику пробоподготовки «высушенной капли».

Проанализировано влияние характеристик биологических матриц на валидационные параметры методов количественного определения лекарственных препаратов с использованием различных типов пробоподготовки.

Впервые разработаны протоколы и даны практические рекомендации по подготовке биологических образцов с использованием технологии «высушенной капли», обеспечивающие достижение приемлемых валидационных характеристик для методов количественного ВЭЖХ-МС/МС определения лекарственных препаратов, с целью их использования при проведении терапевтического лекарственного мониторинга и оптимизации режима дозирования ЛП для различных групп пациентов.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Предложены новые протоколы взятия, хранения и анализа биологических образцов, обеспечивающие достижение приемлемых валидационных характеристик при количественном ВЭЖХ-МС/МС определении лекарственных препаратов с использованием метода «высушенной капли».

Это позволит в дальнейшем успешно проводить фенотипирование с использованием «ивабрадинового теста» и ТЛМ для целого ряда клинических ситуаций, таких как [124]:

- высокая внутри- и межиндивидуальная вариабельность фармакокинетических параметров;
- для новорожденных и тех групп пациентов, где стандартные методы отбора цельной крови вызывают значительные затруднения;
- проведение фармакотерапии у пациентов с нарушением функций почек и/или печени;
- назначение препаратов с узким терапевтическим диапазоном;
- оптимизация режима дозирования препаратов на фоне полипрагмазии;

- изучение соблюдения пациентами назначенной врачом схемы приёма препарата

Методы исследования.

Для разработки ВЭЖЗ-МС/МС методов были опробованы различные варианты хроматографических и масс-спектрометрических условий, включающие варьирование состава элюента, режима элюирования, скорости потока, диапазона регистрируемых масс, поляризации, напряжения электроспрея, потенциал декластеризации, давления газа завесы и газа распыления. А после выбраны оптимальные условия, при которых пик исследуемого вещества был симметричной формы с пригодным для анализа временем удерживания.

Валидацию биоаналитической методики проводили в соответствии с требованиями Евразийского экономического союза, а также с руководствами FDA (U.S. Food and Drug Administration) и EMA (European Medicines Agency).

Положения, выносимые на защиту:

1. Метод «высушенной капли крови» может быть использован для фенотипирования в ивабрадиновом тесте пациентов при проведении ТЛМ, клинических испытаний инновационных лекарственных средств и оценки биоэквивалентности дженериков. Выявлено, что использование в качестве пробоподготовки метода «высушенной капли крови» в отличии от твердофазной экстракции позволяет снизить время анализа более чем в 4 раза. Высушенная капля не требует дополнительного оборудования, более проста в применении и менее затратная по ресурсу и по времени. Также увеличилась чувствительность анализа в 10 раз, при этом количество биообразца для нового метода составляет всего несколько капель цельной крови.

2. Метод «высушенной капли крови» может быть применен для проведения ТЛМ, так как требует малых объемов проб крови, позволяет сократить время анализа, повысить пороги определения лекарственных

средств и проводить мониторинг в любых возрастных категориях, как у новорожденных, так и у пожилых людей. Валидированные параметры методики количественного ВЭЖХ-МС/МС определения концентрации лекарственных средств ванкомицин, пиперациллин и эверолимус могут быть использованы в клинической практике. Образцы «высушенной капли крови» стабильны в течение 14 дней при температуре 22°C и 45 °C. Проведенная оценка специфических параметров валидации не показала влияние на результат анализа и соответствуют критериям приемлемости.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, полученного с использованием современных методов. Разработанными и апробированными протоколами взятия и хранения образцов. А также последующими разработанными методиками количественного ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Основные результаты работы были доложены на XXV Региональной конференции молодых учёных и исследователей Волгоградской области (Волгоград, 24 ноября 2020 года), 78-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов (Волгоград, 14–16 октября 2020 г.), 76-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, (Волгоград, 25–28 апреля 2018 г.).

Личный вклад автора

Автор принимал активное участие на всех этапах работы. Проведён анализ литературных данных по теме исследования, на основании чего были разработаны соответствующие протоколы. Автор активно принимал участие в экспериментальной части, обработка полученных результатов и написании научных статей

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ из которых 6 в рецензируемых научных изданиях, включенных в перечень Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, полученные результаты и их обсуждение, а также выводы, практические рекомендации и список литературы, включающий 201 источник из которых 45 отечественных и 156 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 29 рисунками и 18 таблицами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Терапевтический лекарственный мониторинг

В аптеках появляются десятки новых лекарственных средств, дженериков и усовершенствованных лекарственных форм [118]. Однако вместе с ростом числа лекарственных препаратов, возрастает риск неблагоприятных побочных реакций, связанных с более интенсивной фармакотерапией. В промышленно развитых странах, например, в США, осложнения лекарственной терапии занимают 4-е место в качестве причин смертности после сердечно-сосудистых заболеваний, злокачественных опухолей и инсультов [118].

Для многих лекарственных препаратов риск проявления неблагоприятных эффектов при достижении их минимальной токсической концентрацией достаточно высок. Такие препараты имеют узкий диапазон между минимальной концентрацией, оказывающей необходимый лекарственный эффект, и минимальной токсической, при которой проявляются побочные эффекты. Этот диапазон является желательным терапевтическим коридором препарата.

Однако достижение необходимого эффекта лекарственного препарата в реальной клинической практике и корреляция его с концентрацией в крови носит достаточно сложный характер [19].

Увеличивает вероятность достижения неблагоприятных лекарственных реакций не только узкий терапевтический диапазон препарата, но и ряд функциональных состояний организма: патологии, возрастные и генетические особенности, разница в биодоступности, а также дополнительное взаимодействие лекарственных препаратов, принимаемых одновременно [11].

Также на уровень концентрации в крови и, следовательно, на фармакокинетические параметры и развитие фармакодинамического эффекта могут влиять: количество принимаемой жидкости, интервал времени между едой и приёмом препаратов, рН желудочного сока, моторика желудочно-кишечного тракта, объём и состав пищи, интервал времени между едой и приёмом препаратов. На характер распределения препарата внутри сосудистого русла влияет: растворимость в липидах, связывание препарата и его метаболитов с белками, интенсивность регионарного кровотока, наличие сопутствующей соматической патологии. На элиминацию лекарственных веществ может повлиять назначение индукторов или ингибиторов микросомальных ферментов печени, наличие сопутствующей соматической патологии [11].

Среди множества факторов, определяющих отклонение от терапевтического уровня лекарственных средств в крови, хочется отметить важность экологической ситуации в регионе проживания больных. Ранее было установлено, что у детей больных эпилепсией в экологически неблагоприятном регионе концентрация противосудорожных средств чаще не достигала необходимого уровня по сравнению с больными более благоприятных районов [165, 11].

Множество вышеперечисленных факторов вызывает необходимость к более индивидуальному подходу к каждому пациенту, учитывая его различные факторы вариабельности, которые могут привести к разной концентрации лекарственного препарата в крови и, следовательно, разному фармакодинамическому эффекту. Одним из таких подходов является использование терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ).

ТЛМ является важным инструментом повышения эффективности и безопасности фармакотерапии за счёт проведения индивидуализированного подбора и выбора оптимальных режимов дозирования лекарственных препаратов на основании изучения профиля концентраций действующих

веществ и/или их метаболитов в различных биологических матрицах пациентов [5, 36].

Главное положение терапевтического лекарственного мониторинга основано на том, что наблюдается равновесное состояние между концентрацией активного вещества в крови и в месте его действия.

Необходимость проведения ТЛМ обусловлена следующими основными причинами [19, 37]:

- для выявления соотношения между дозой и концентрацией препарата в крови, с одной стороны, и фармакологическим (или токсическим) эффектом препарата – с другой:

- проведение фармакотерапии у пациентов с нарушенной функцией почек или печени;

- оптимизация режима дозирования препаратов на фоне полипрагмазии;

- изучение соблюдения пациентами назначенной врачом схемы приёма препарата;

- высокой межиндивидуальной вариацией фармакокинетических параметров, приводящей к существенным различиям уровня стационарных концентраций препарата в крови;

- узким терапевтическим коридором многих лекарственных препаратов, когда зона положительного эффекта находится достаточно близко от зоны побочных эффектов.

Список таких лекарственных веществ, регламентируется приказом министерства здравоохранения российской федерации от 2 ноября 2012 г. N 575н об утверждении порядка оказания медицинской помощи по профилю "клиническая фармакология" подлежащих мониторингу в России, содержит около 50 наименований. ТЛМ активно используется в практике лечения онкологических заболеваний. Особое внимание заслуживает обеспечение эффективности и безопасности использования противоопухолевых препаратов, антибиотиков, иммуносупрессантов, противосудорожных и

противоэпилептических препаратов, что обусловлено рядом причин: серьезные побочные эффекты, тяжелое состояние пациентов, широкий спектр сопутствующей терапии, отсутствие адекватных временных ресурсов для подбора оптимальных дозировок. Широкое использование препаратов данных групп, в ряде случаев, не приводит к ожидаемому эффекту терапии, что может быть связано фармакокинетическими особенностями препарата.

(Родионов Г. Г. и др, 2018)

При социально значимых и широко распространенных заболеваниях, к которым относится сахарный диабет, во всем мире чаще применяют воспроизведенные препараты [25]. Количество производителей глибенкламида составляет десятки, причем выпускаются как монопрепараты в различных дозировках, так и комбинированные лекарственные формы. Только в России на начало 2020 года зарегистрировано 20 препаратов глибенкламида. При этом технология производства, используемая субстанция, и вспомогательные вещества значительно отличаются у разных производителей. В результате на практике после подтвержденной в ходе регистрации биоэквивалентности препарата проявляется его терапевтическая неэквивалентность. Как показано в работах [31, 166], это стало общемировой проблемой, решением которой может быть более тщательная экспертиза препаратов при регистрации или проведение постмаркетинговых исследований, как это делается в США. В настоящее время в нашей стране зарегистрированы препараты ГЛБ, фармакокинетика которых принципиально различается, её особенности влияют на риск развития нежелательных реакций, что и вызывает необходимость проведения терапевтического лекарственного мониторинга [7].

Существует необходимость проведения ТЛМ антипсихотропных лекарственных средств, так как значительная индивидуальная вариабельность концентрации данных препаратов у различных пациентов оказывает существенное влияние на результаты лечения. Однако не для всех препаратов целесообразно его проводить, необходимо учитывать

комплексное состояние пациента и не проводить изменение лекарственной терапии, основываясь только о концентрации антипсихотропных средств [32, 102].

ТЛМ позволяет быстро и точно определять индивидуальный уровень статинов и их метаболитов в крови у конкретного пациента. Этот метод можно использовать для персонализированной терапии у пациентов с нарушением функции печени, почек, желудочно-кишечного тракта, в условиях полипрагмазии, а также для проверки комплаентности пациента при выявлении причин недостаточной эффективности лечения [16]. Однако в настоящий момент применение ТЛМ при назначении статинов не имеет широкого распространения, и, соответственно, отсутствуют рекомендации к его проведению.

По мнению авторов, одного исследования [38], в настоящее время должны быть разработаны, утверждены и испытаны на применимость методы определения в плазме крови человека всех продаваемых в настоящее время статинов и их активных метаболитов, которые могут в дальнейшем применяться для мониторинга терапевтических препаратов, а также для проверки приверженности к лечению [38].

Различные факторы вариабельности фармакологического ответа лекарственных препаратов предопределяет необходимость в более точной и персонализированной терапии не только на уровне генотипа, но и фенотипа [129].

1.2 Фенотипирование

Разрабатываемые новые методы, направленные на индивидуализацию фармтерапии, должны учитывать влияние различных факторов на меж- и внутрииндивидуальную вариабельность. Данные факторы этой

вариабельности, которые могут быть обусловлены полом, возрастом пациентов, генетическим полиморфизмом, по мимо этого должны учитываться различные сопутствующие заболевания, экология, диета, а также различные межлекарственные взаимодействия [24].

Особое место среди данных факторов занимают различия в скорости биотрансформации лекарственных веществ, что зависит от активности участвующих в этих трансформациях ферментов. При этом ряд факторов могут как повышать, так и понижать данную активность и в свою очередь оказывать влияние на концентрацию того или иного лекарственного препарата в крови и соответствующий фармакологический ответ.

Группой исследователей было установлено, что изофермент CYP3A4 участвует в метаболизме более 60% лекарственных препаратов, многие из которых либо усиливают, либо угнетают его активность. Это означает, что при приеме нескольких лекарственных препаратов изменяется их метаболизм и вследствие этого концентрации данных препаратов в крови [129]. Получение не целевых концентраций приводит к неэффективной фармтерапии и повышению риска нежелательных реакций, что вызывает необходимость в корректировке режимов дозирования и разработке других стратегий назначения лекарственных препаратов и поиску подходов к определению активности ферментов метаболизма данных лекарственных средств [129].

Существуют два принципиальных подхода к определению активности таких ферментов: гено- и фенотипирование. Фенотипирование заключается в оценке их активности данных ферментов *in vivo* с использованием различных маркерных субстратов [24].

Были проведены исследования, где в качестве маркерного субстрата для прогнозирования активности данного фермента был выбран ивабрадин, метаболизм которого связан исключительно с CYP3A4. Было предложено оценивать ингибирование или индукцию изоформы CYP3A4 с помощью метаболического отношения N-деметиливабрадин/ивабрадин. Результаты

показали, что данное отношение статистически значимо уменьшается на фоне приема ингибитора CYP3A4 (грейпфрутовый сок) и достоверно увеличивается на фоне приема индуктора CYP3A4 (зверобой продырявленный) [41].

Совместный прием нескольких лекарственных препаратов также может повлиять на их метаболизм. При назначении нескольких лекарственных препаратов необходимо учитывать их конкурентное связывание с ферментами и вследствие этого изменение их активности. Так ивабрадин, благодаря своим фармакокинетическим свойствам, может конкурировать с другими субстратами за связывание с CYP3A4, что будет снижать его активность. При совместном назначении ивабрадина со статинами — субстратами CYP 3A4 возможно увеличение плазменных концентраций последних с повышением риска развития нежелательных лекарственных реакций [21].

Таким образом, фенотипирование CYP3A4 с использованием «ивабрадинового теста» позволяет проводить мониторинг изменения активности данного изофермента у пациентов, получающих его индукторы либо ингибиторы в составе плановой фармакотерапии. Также, метаболическое отношение может служить достоверным показателем активности фермента CYP3A4 и использоваться для разработки протокола оптимизации фармакотерапии у пациентов на фоне полипрагмазии [12].

Однако повышение метаболического отношения может быть связано с индуцирующим действием алкоголя на различные ферментативные системы организма, включающие цитоплазмальные оксидазы, микросомальные оксигеназы и ряд изоферментов системы цитохрома P450, в том числе и CYP3A4, субстратом которого является ивабрадин. В то же время, наблюдаемое снижение общей экскреции ивабрадина и его метаболита свидетельствует о снижении скорости всасывания ивабрадина в желудочно-кишечном тракте [32].

Группой исследователей было предложено фенотипирование CYP2C9, как способ оценки риска развития нежелательных реакций при применении глибенкламида. Данный подход можно реализовать путем сравнения концентраций веществ, метаболизируемых изоферментом CYP2C9, в группах пациентов с полиморфизмом и без полиморфизма соответствующего гена. Например, S. Gravel с соавт. [11] было показано, что у больных сахарным диабетом наблюдается незначительное повышение активности этого изофермента. Авторы данного исследования сделали вывод, что более глубокое понимание метаболических процессов позволит увеличить эффективность и безопасность фармакотерапии

Однако ввиду сложностей в оценке терапевтической эквивалентности препаратов глибенкламида, терапевтический лекарственный мониторинг может оказаться наиболее полезным методом контроля, так как гено- и фенотипирование CYP2C9 позволяют прогнозировать только скорость биотрансформации препаратов глибенкламида, в то время как при прямом определении концентрации в ходе ТЛМ результаты зависят и от скорости всасывания препарата в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, ТЛМ может помочь пациентам с сахарным диабетом 2 типа в составе комбинированной терапии [7].

1.3 Методы и стратегии, используемые при терапевтическом лекарственном мониторинге

В настоящее время применялись различные методы и стратегии проведения терапевтического лекарственного мониторинга при использовании препаратов с узким терапевтическим диапазоном и в тех клинических случаях, для которых необходим ТЛМ.

Наиболее востребованным оказался мониторинг противоэпилептических средств у больных эпилепсией и определение циклоспорина и такролимуса у пациентов с трансплантацией органов (чаще с

пересадкой почек) [32, 6]. Из исследований, проводимых авторами, более чем у $\frac{1}{4}$ больных при эмпирическом назначении противоэпилептических препаратов оптимальный уровень концентраций в крови не достигается. Таким образом, очевидна необходимость ТЛМ при лечении противоэпилептическими средствами, учитывая, что эффективность данных препаратов определенно зависит от их содержания в крови [165, 187].

Иммуносупрессанты также являются препаратами, для которых необходим терапевтический лекарственный мониторинг. После трансплантации органов необходимо принимать иммунодепрессанты в течение всей жизни, чтобы избежать реакции отторжения. При этом иммуносупрессанты обладают очень узким терапевтическим диапазоном и высокой токсичностью. Применение в клинической практике лекарственного мониторинга делает возможным оптимизацию иммуносупрессивной терапии, что позволяет поддерживать концентрацию препаратов в рамках терапевтического диапазона и избежать нежелательных реакций [165]. Поэтому жизненно важным является мониторинг основных иммунодепрессантов: циклоспорина А, такролимуса, сиролимуса и эверолимуса для регулирования дозы лекарств для каждого индивидуального пациента в зависимости от концентрации препарата в крови [5, 26, 36, 180,].

Мониторинг концентрации иммуносупрессантов должен проводиться каждый раз при коррекции дозы этих препаратов, изменении схемы иммуносупрессивной терапии, а также назначении сопутствующих препаратов, что часто используется в различных стратегиях иммуносупрессивной терапии [165].

В настоящее время для определения концентрации иммуносупрессантов все чаще в клинических лабораториях используются ВЭЖХ/МС/МС как наиболее эффективные и специфичные методы анализа. Так, в клинике университета Мюнхена ежедневно проводится анализ около 70 образцов на содержание сиролимуса и циклоспорина А с использованием ВЭЖХ/МС/МС системы [180].

Стандартные режимы дозирования у пациентов, находящихся в критическом состоянии, не всегда могут привести к желаемым результатам, поэтому всё чаще используется адаптация режимов дозирования в зависимости от демографических, клинических и/или ФК данных конкретного пациента, характеристик инфекционного процесса, в том числе и для терапии меропенемом [137]. По фармакокинетической модели или по индивидуальным значениям ФК параметров, оцененным на основе данных терапевтического лекарственного мониторинга, зная или предполагая уровень МПК, с помощью моделирования можно прогнозировать вероятность достижения выбранной фармакодинамической цели при планируемом режиме дозирования, чтобы не поставить под угрозу эффективность проводимой терапии [8].

Многие исследователи сходятся во мнении, что индивидуализация дозирования на основе ТЛМ как с использованием специального программного обеспечения, так и без него, может улучшить результаты терапии бета-лактамами антибиотиками, включая меропенем [137, 30]. Считается, что процедура ТЛМ меропенема не даёт дополнительное клиническое преимущество при относительно лёгких инфекционных процессах и/или низком уровне резистентности микроорганизмов. Однако у пациентов с труднопредсказуемой фармакокинетикой или в случае тяжёлых инфекций, вызванных патогенными микроорганизмами с высоким значением МПК, ТЛМ меропенема помогает в персонализации терапии [19,30]. Кроме того, по данным литературы, пациенты, которые с наибольшей вероятностью получают пользу от ТЛМ, включают тяжелобольных, пожилых людей, пациентов с нарушением функции почек, в том числе находящихся на диализе, больных муковисцидозом, остеомиелитом, простатитом, менингитом и др. [19, 37, 14].

Нарушения функций почек также вносит существенный вклад в фармакокинетические параметры. Ранее уже были проведены исследования, которые были проведены методом математического моделирования и

терапевтического лекарственного мониторинга у пациентов с нарушением функции почек и с инфекционными осложнениями. При этом было продемонстрировано, что при стандартном подходе к дозированию в 65 % случаев не удаётся достичь целевых значений для *Strough* 15–20 мкг/мл через 48 ч от начала терапии. Что свидетельствует о высокой вариабельности параметров ФК ванкомицина, особенно в группе пациентов с нарушением функции почек [150, 20].

Проводились исследования, в результате которых оказалось, что разные препараты вальпроевой кислоты и карбамазепина не всегда обеспечивают одинаковые уровни лекарственного средства в плазме крови. Следовательно, при переходе с одного противоэпилептического препарата к другому, содержащему аналогичную фармацевтическую субстанцию, необходима коррекция доз с учетом данных ТЛМ [165].

Различные стратегии и методы применения терапевтического лекарственного мониторинга не всегда оптимальны для всех клинических ситуаций, а в некоторых случаях его проведение невыполнимо в принципе.

1.4 Сложности терапевтического лекарственного мониторинга

Для некоторых лекарственных препаратов в настоящее время не хватает или нет рекомендаций по терапевтическому мониторингу (Шульц и Махмуд, 2020). Однако ТЛМ может помочь определить оптимальный диапазон концентрации в сыворотке/ плазме крови для конкретного больного, что позволит поддерживать эффективную концентрацию препарата, а также возникновение побочных эффектов [1, 6].

При этом разработка и проведение аналитических методов определения тех или иных лекарственных препаратов имеет достаточно высокую стоимость и трудоемкость, что делает терапевтический лекарственный мониторинг не всегда доступным во всех медицинских учреждениях [32, 40].

Также остаются вопросы о стандартизации терапевтического лекарственного мониторинга. Существуют различные методы анализа и интерпретации данных, создаются новые способы анализа и пробоподготовки, при этом не всегда эти методики воспроизводимы, а отсутствие единой методологии, особенно для новых методов, может привести к различным результатам [140].

Проведение терапевтического лекарственного мониторинга, как правило, связано с использованием сыворотки крови, либо плазмы в качестве биологического материала для количественного определения изучаемого лекарственного препарата и/или его метаболита. Основой для получения данных биоматриц выступает цельная кровь, взятая у пациента путём стандартной венепункции. Однако во многих ситуациях данный способ взятия проб не является оптимальным, либо невыполним в принципе, что существенно ограничивает возможности оптимизации фармакотерапии с использованием ТЛМ в реальной клинической практике [152, 180].

Например, в случае проведения ТЛМ у новорожденных детей, для которых лекарственная терапия, особенно препаратами с узким терапевтическим диапазоном, вызывает ряд трудностей [37, 119, 33].

Особенно часто назначаемыми препаратами для новорожденных являются антибиотики. Около 2,5 % доношенных детей получают антибиотикотерапию в первые три дня жизни [43]. Однако следует учитывать, что набор различных физиологических и аутоиммунных особенностей у данной группы пациентов влияет на фармакокинетику лекарственных препаратов и может привести к неэффективной фармакотерапии и развитию нежелательных лекарственных реакций, что осложняет применение антибиотиков, с узким терапевтическим диапазоном. Таким препаратом является ванкомицин, который назначается при лечении тяжелых инфекций [37, 43, 39]. Это делает невозможным использование у данной категории пациентов дозировок, рассчитанных для других возрастных групп, в связи с высоким риском развития нежелательных

явлений и лекарственных взаимодействий, что обуславливает целесообразность проведения ТЛМ [148].

Однако необходимость в достаточно большом количестве образцов крови, которое необходимо взять у данных пациентов, может вызвать некоторые проблемы, поскольку множественные заборы крови в достаточно большом количестве могут привести к неблагоприятным гемодинамическим эффектам у новорожденных и детей младшего возраста [186, 163].

У пожилых людей стандартная венепункция может представлять также сложную задачу из-за возрастных изменений кожи и кровеносных сосудов. Также остеоартрит может препятствовать выпрямлению руки при венепункции.

В связи с этим необходимы новые способы оптимизации ТЛМ, построение фармакокинетических моделей и новые методы получения биообразцов для проведения терапевтического лекарственного мониторинга [91].

Исходя из этого, в последние годы всё большее внимание уделяется разработке более удобных и менее инвазивных технологий получения биоматериала, одним из которых является метод «высушенной капли» (от англ. – dried blood spot, DBS) [23, 167, 176, 108].

1.5 Общие положения метода “высушенной капли”

Отбор проб «высушенной капли крови»— это метод пробоподготовки, который является относительно простым методом сбора небольших объемов крови, предлагающий отойти от сбора плазмы и не предполагает заморозки образцов.

Метод “высушенной капли крови” представляет широкий спектр возможных применений, которые невыполнимы или затруднены с использованием традиционных методов сборов биообразцов [1, 61, 120, 152, 183].

Технология основана на получении минимальных количеств капиллярной крови путем пальцевого прокола с помощью специального ланцета. Первая капля крови содержит большое количество тканевой жидкости и поэтому ее убирают ватным диском. Последующие капли наносятся на специальные бумажные фильтры. Объем собранной крови строго стандартизован с помощью отмеченной области на фильтре. Затем образец сохнет на фильтровальной бумаге при комнатной температуре и используется для анализа [50, 73, 117, 124, 175, 71].

Стандартный подход к подготовке образца для анализа состоит из выреза диска фильтровальной карты определенного диаметра с последующей экстракцией аналита. Вырезанный диск образца размером от 3 до 8 мм экстрагируется органическим растворителем или смесью водного и органического растворителя. Внутренний стандарт добавляют к экстракционному растворителю. Затем экстракт анализируют с помощью различных аналитических методик, одной из которых является ВЭЖХ-МС-МС. Такой стандартный подход (извлечения аналита, предоставляющий жидкий образец для ВЭЖХ-МС/МС анализа), подходит для подавляющего большинства соединений [95, 109, 143, 170].

Образцы «высушенной капли» совместимы с большинством биоаналитических методик, которые позволяют существующим лабораториям легко перенимать эту технологию. «Высушенная капля» — это универсальная матрица, поэтому все, что может быть проанализировано из жидкой цельной крови, плазмы или сыворотки, может быть проанализировано и в образцах «высушенной капли» [183, 66, 196, 93].

При использовании оптимизированной пробоподготовки и метода анализа образцов, данный метод может иметь широкое применение в доклинических и клинических исследованиях, терапевтическом и токсикологическом мониторинге лекарственных средств.

«Высушенная капля крови» представляет более эффективную модель анализа лекарственных средств и может обеспечить столь необходимые

фармакокинетические результаты достаточно эффективным и надежным способом [103, 66, 106, 128,145].

Благодаря многочисленным преимуществам этот метод отбора проб выглядит достаточно привлекательным, а его преимущества перед стандартными методами пробоподготовки привлекли внимание многих исследователей [199,106, 135, 149].

1.6 Преимущества и недостатки метода высушенной капли

Измерение концентраций лекарственных препаратов в высушенных каплях крови представляет собой способ преодоления многих ограничений терапевтического лекарственного мониторинга. Образцы крови в небольшом объеме, полученные путем пальцевого или пяточного прокола, могут быть взяты серийно и нанесены на фильтровальную бумагу, позволяя расширить фармакокинетические / фармакодинамические исследования лекарственных препаратов [68, 107, 191].

Большинство аналитов могут быть более стабильны в образцах «высушенной капли», чем в замороженных образцах.

В отличие от жидких образцов плазмы или сыворотки, данные образцы имеют более удобное хранение и транспортировку. Образцы DBS могут быть отправлены или транспортированы с помощью обычных почтовых систем без специальных почтовых коробок [35, 100, 104].

Наборы для отбора проб для стандартных образцов крови требуют больше лабораторного оборудования, особенно пробирок, чем для пробоотбора DBS [59, 172].

Более того, процесс сбора таких образцов не требует использования антикоагулянтов, которые ограничивают ряд манипуляций [49, 199].

Все вышеперечисленные преимущества метода «высушенной капли крови» могут помочь в проведении терапевтического лекарственного мониторинга, особенно в тех ситуациях, где он был затруднен с

использованием стандартных методов пробоподготовки. А также на стадии разработки лекарственных препаратов и составлении различных популяционно фармакокинетических моделей разных групп пациентов [48, 77, 99, 133, 168].

Однако данный метод не лишен недостатков, которые заключаются в следующем:

- Доступны только небольшие объемы образцов крови, поэтому требуется чувствительный метод анализа.

- Риск контаминации. Если один и тот же человек выполняет прокол пальца и дозирование, возможен риск загрязнения фильтровальной бумаги.

- Нет запасного образца.

- Несмотря на приемлемую подготовку пациента, отбор проб не всегда успешен.

- Требуется широкая валидация. Следует понимать влияние изменений значений гематокрита (Hct) на размер и однородность пятна, а также их влияние на эффективность анализа. Влияние объема пятен крови и однородности пятна должны быть дополнительно изучены [72, 78, 134, 146].

- Концентрация лекарственного препарата в образцах капиллярной крови, может отличаться от концентрации лекарственного препарата в образцах венозной крови, так как кровь, полученная методом «высушенной капли», состоит из клеток, плазмы и межклеточной жидкости [75, 67, 155, 199].

За последние 10 лет было опубликовано определенное количество статей, описывающих валидацию нового метода и возможности применения его в рамках проведения терапевтического лекарственного мониторинга различных классов препаратов, таких как анальгетики, антибиотики, противосудорожные, антидепрессанты, противомалярийные, противогрибковое, антиретровирусные, мочегонные, иммунодепрессанты и др (Табл. 1) [156, 125, 97, 76, 160, 86, 70, 151, 96].

Однако не было проведено систематического анализа по специфическим показателям валидации и влияния этих параметров на результат анализа.

Таблица 1. Примеры лекарственных средств, для которых использовался метод «высушенной капли крови».

Класс лекарственного препарата	Лекарственный препарат	Аналитический метод	Ссылки
Иммунодепрессанты	Сиролимус, Эверолимус, Такролимус, Циклоспорин А	ВЭЖХ-МС/МС	[123], [55], [184], [105],[122], [179], [198], [60], [96]
Антибиотики	Ванкомицин, Моксифлоксацин, Пиперациллин, Тазобактам, Меропенем	ВЭЖХ-МС/МС	[47], [58], [81], [182]
Противогрибковые	Вариконазол, Флуконазол	ВЭЖХ-МС/МС	[84]
Противоопухолевый	Метотрексат, Микофеноловая кислота	ВЭЖХ-МС/МС	[101], [164]

Все вышеперечисленное создает необходимость в разработке и оптимизации методов количественного ВЭЖХ-МС/МС, определения лекарственных препаратов в образцах «высушенной капли» для последующего терапевтического лекарственного мониторинга.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были разработаны надлежащие протоколы взятия образцов «высушенной капли крови» из пальца для взрослых пациентов и из пятки для новорожденных детей.

Протокол взятия и хранения образцов «высушенной капли крови» для новорожденных детей:

1. Оформить информированное добровольное согласие законного представителя;
2. Подписать карту/капли с идентификатором пациента и датой.
3. Выбрать место проведения пункции на боковой стороне пятки.
4. Разогреть стопу с помощью теплой пеленки.
5. Обработать руки и надеть стерильные перчатки.
6. Расположить пятку ниже туловища ребенка и удерживать ее без резкого сгибания лодыжки.
7. За 5 минут до укола пациенту per os шприцом ввести 30% р-р глюкозы в дозе, указанной на рис. 1 + нутритивное сосание (Табл.2);

Таблица 2. Доза 30% раствора глюкоза для новорождённых детей.

Масса тела,	Количество раствора, мл
<1500	0,2
1500-2000	0,3
2000-3000	1
>3000	2

Продолжительность действий: 5-10 минут.

Частота использования:

Доношенные новорождённые – 6-8 раз в сутки

Недоношенные новорождённые – 4-5 раз в сутки.

8. Обработать место проведения пункции с помощью антисептического раствора и дать ему высохнуть.

9. Повторно ввести пациенту per os шприцом 30% p-p глюкозы непосредственно перед уколом;
10. Быстро проколоть кожу латерально, с помощью ланцета и стереть стерильным ватным шариком первую каплю крови.
11. Сразу после укола дать 30% p-p глюкозы per os + ненутритивное сосание;
12. Удерживать место пункции внизу, осторожно надавливая на прилегающую область и произвести взятие крови на бланк на фильтровальную бумагу;
13. Держать карту, не касаясь отмеченной области.
14. Осторожно прикоснувшись карточкой фильтровальной бумаги к капле крови, нанести её на карту. Дать карточке впитать кровь, пока круг не заполнится. Не прикасаться к отмеченной области после нанесения крови.
15. Дать пятну крови высохнуть в темном месте, без прямых солнечных лучей в течение не менее 4 часов. Не нагревать и не допускать контакта образцов высушенной капли с другими поверхностями во время процесса сушки.
16. Запечатать карту (или части карты) в газонепроницаемом пакете с застежкой-молнией. Хранить не более одной карты в упаковке в холодильнике до отправки в лабораторию при 2–8°C.

**Протокол взятия и хранения образцов «высушенной капли крови»
из пальца руки:**

1. Оформить информированное добровольное согласие законного представителя;
2. Подписать карту/капли с идентификатором пациента и датой.
3. Выбрать место проведения пункции на указательном пальце.
4. Обработать руки и надеть стерильные перчатки.
5. Обработать место проведения пункции с помощью антисептического раствора и дать ему высохнуть.

6. Быстро проколоть кожу вместе с помощью ланцета и стереть стерильным ватным шариком первую каплю крови.
7. Удерживать место пункции внизу, осторожно надавливая на прилегающую область и произвести взятие крови на бланк на фильтровальную бумагу;
8. Держать карту, не касаясь отмеченной области.
9. Осторожно прикоснувшись карточкой фильтровальной бумаги к капле крови, нанести её на карту. Дать карточке впитать кровь, пока круг не заполнится. Не прикасаться к отмеченной области после нанесения крови.
10. Дать пятну крови высохнуть в темном месте, без прямых солнечных лучей в течение не менее 4 часов. Не нагревать и не допускать контакта образцов высушенной капли с другими поверхностями во время процесса сушки.
11. Запечатать карту (или части карты) в газонепроницаемом пакете с застежкой-молнией. Хранить не более одной карты в упаковке в холодильнике до отправки в лабораторию при 2–8°C.

Первый этап работы включал анализ существующих методик определения выбранных лекарственных препаратов, по результату которого был сформирован план разработки методов количественного определения с помощью ВЭЖХ-МС/МС в плазме крови и образцах высушенной капли [45, 132, 190, 185, 177, 91, 79, 158, 88, 154].

В процессе разработки методов были опробованы различные варианты хроматографических и масс-спектрометрических условий, включающие варьирование состава элюента, режима элюирования, диапазона регистрируемых масс, типа ионизации аналитов, напряжения электроспрея, потенциал декластеризации, давления газа завесы и газа распыления. А после выбраны оптимальные условия, при которых пик исследуемого вещества

будет симметричной формы с пригодным для анализа временем удерживания [53,114,196,52,139,157,169,161,64].

2.1 Основное оборудование и реактивы, используемые в исследованиях

Разделение компонентов проводили с использованием ВЭЖХ системы Agilent 1260 (Agilent, США) с бинарным насосом и термостатируемым автосемплером. Анализируемые вещества детектировали с помощью гибридной масс-спектрометрической системы Sciex QTRAP 5500 (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур).

Для построения метода мониторинга множественных реакций (MRM) использовались ионные переходы, соответствующие наибольшей интенсивности ионов-«продуктов».

Для приготовления стандартных растворов взвешивали сухие навески на полумикроаналитических весах Explorer EX225/AD (Ohaus, США) и далее помещали в мерную колбу и доводили до метки сверхчистой водой Milli-Q (18.2 МОм·см при 25 °С), полученная с использованием системы очистки воды (Simplicity UV, Франция).

Для приготовления подвижной фазы использовали ацетонитрил gradient HPLC grade 99,9% (Scharlau, Испания), сверхчистая вода Milli-Q (18.2 МОм·см при 25 °С), муравьиная кислота gradient HPLC grade (Scharlau, Испания), метанол HPLC grade (Scharlau, Испания).

В данной методике для приготовления калибровочных стандартов и образцов контроля качества были использованы стандарты ванкомицина и норванкомицина, как внутреннего стандарта (Augsburg, Germany, purity grade >95.0%), ивабрадина (Servier, Франция) и донпередон N-десметиливабрадина (Toronto Research Chemical Inc., Канада), эверолимуса (Round Rock, Texas, USA) и эверолимуса-D4 (Toronto, Ontario, Canada), пиперациллина и празозина (Sigma Aldrich, Milan, Italy).

Матрицей для приготовления калибровочных стандартов и образцов контроля качества служила плазма крови человека, полученная от здоровых добровольцев, а также цельная кровь для приготовления образцов «высушенной капли крови».

Для приготовления калибровочных стандартов и образцов контроля качества в плазме крови дозатором перенесли по 100 мкл плазмы в микропробирки на 1.5 мл, добавили дозатором 10 мкл рабочего раствора соответствующей концентрации до получения калибровочных растворов 1 - 1000 нг/мл для ивабрадина и 0,5 - 100 мкг / мл для пиперациллина, 1 - 100 мкг/мл для ванкомицина и 1 - 50 нг / мл для эверолимуса.

Образцы контроля качества были приготовлены со следующими четырьмя уровнями концентрации: 0,5 мкг / мл (нижний предел количественного определения - НПКО), 1,5 мкг / мл (нижний уровень контроля качества), 50 мкг / мл (средний уровень контроля качества) и 75 мкг / мл (высокий уровень контроля качества) для пиперациллина, 1; 7,5; 35; 75; мкг / мл для ванкомицина, 1; 3; 25; 40 нг/мл для эверолимуса, а также 1, 3, 400, 750 нг/мл для ивабрадина.

Для приготовления калибровочных стандартов и образцов контроля качества в образцах DBS. 100 мкл цельной крови переносили в микропробирки на 1,5 мл и добавили 10 мкл рабочего раствора соответствующей концентрации для получения калибровочных растворов: 1 - 1000 нг/мл для -деметиливабрадина и ивабрадина и 0,5 - 100 мкг / мл для пиперациллина, 1 - 100 мкг/мл для ванкомицина и 1 - 50 нг / мл для эверолимуса. Для образцов контроля качества 0,5 мкг / мл (НПКО), 1,5 мкг / мл (нижний уровень контроля качества), 50 мкг / мл (средний уровень контроля качества) и 75 мкг / мл (высокий уровень контроля качества) для пиперациллина, 1; 7,5; 35; 75; мкг / мл для ванкомицина, 1; 3; 25; 40 нг/мл для эверолимуса а также 1, 3, 400, 750 нг/мл для -деметиливабрадина и ивабрадина.

Далее 20 мкл полученных рабочих растворов наносили на фильтровальную бумагу Whatman FTA® DMPK-B и давали сохнуть при комнатных условиях в течение 3 часов.

Экстракцию аналитов проводили следующим образом: экстрагируем 100 мкл образца добавлением 400 мкл охлажденного до +4°C ACN. Перемешивали на вортексе (Biosan, Латвия) 1–3 мин. Центрифугируем образцы при 15000 об/мин 2 мин на центрифуге 5427 R (Eppendorf, США) при +4°C. 200 мкл полученной надосадочной жидкости перенесли в виалы (Рис. 1).

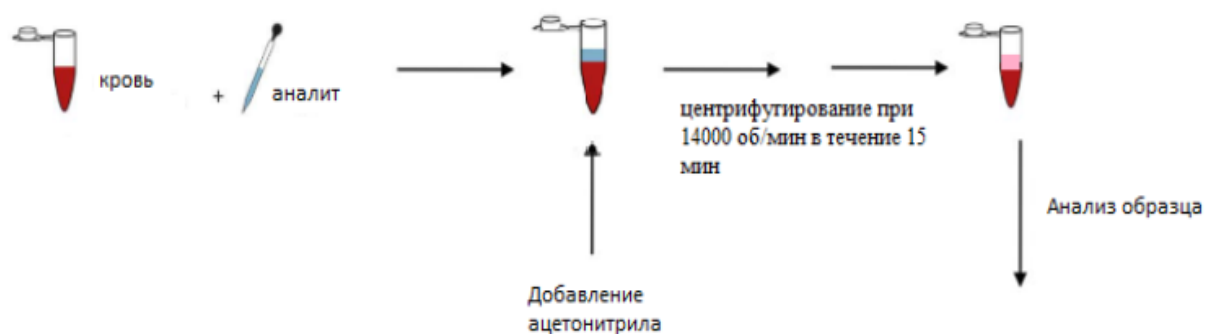


Рисунок 1. Схема пробоподготовки с использованием преципитации белков.

Для подготовки образцов DBS из карт был вырезан диска диаметром 6 мм специальным устройством для выреза маркированных кругов Uni-Core, который помещали в пробирку и экстрагирован экстракционным раствором.

Для ивабрадина экстракционный раствор представлял собой 100 мкл раствора ацетонитрил / вода 50:50 (об. / Об.), который содержал 100 мкг / мл внутреннего стандарта. Экстракцию проводили с помощью шейкера в течение 20 мин при 25 ° С, затем раствор переносили в новые пробирки и анализировали с помощью ВЭЖХ-МС / МС (Рис. 2).

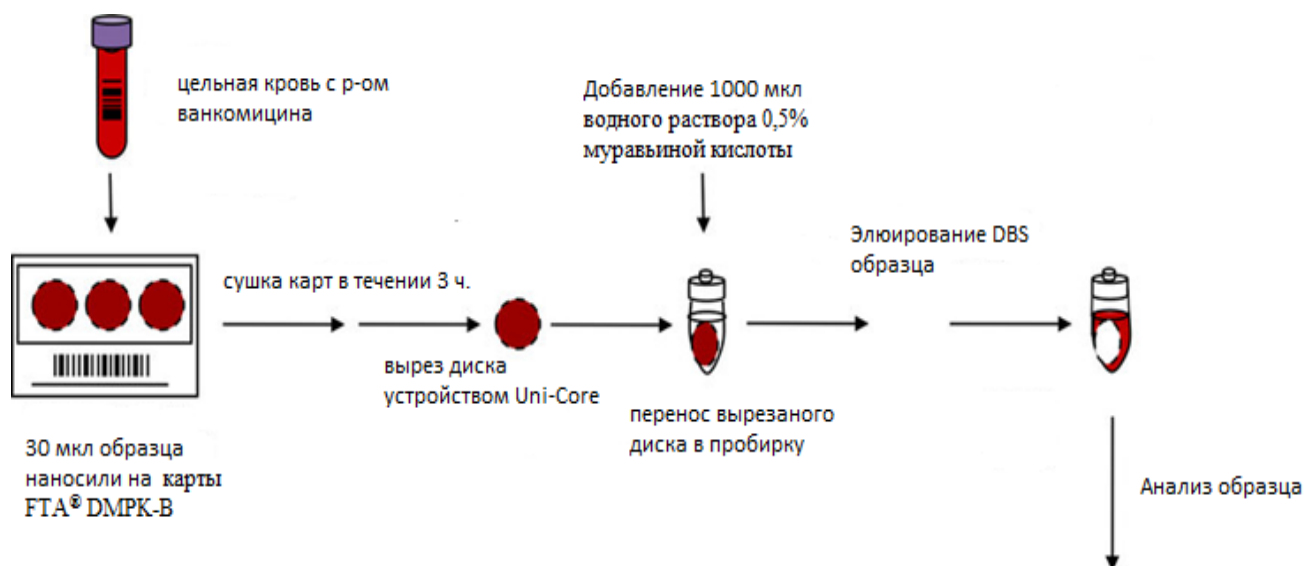


Рисунок 2. Схема пробоподготовки используя метод «высушенной капли».

Для пиперациллина экстракционный раствор представлял собой 100 мкл раствора метанол / вода 70:30 (об. / Об.), который содержал 220 мкг / мл внутреннего стандарта. Экстракцию проводили с помощью шейкера в течение 60 мин при 25 ° С, затем раствор переносили в новые пробирки и анализировали с помощью ВЭЖХ-МС / МС.

Экстракционный раствор DBS представлял собой смесь метанола и воды (1: 1, об. / Об.), Содержащий 0,1% муравьиной кислоты и внутренний стандарт норванкомицина. Диск из образца DBS диаметром 6 мм перенесли в пробирку, после чего добавляли 400 мкл экстракционного раствора. Пробирку перемешивали при 1000 об / мин в течение 30 минут при 25 ° С. После 10 мин центрифугирования при 10.000 g аликвоту 350 мкл надосадочной жидкости выпаривали при 45 ° С в вакуумной центрифуге. Высушенный экстракт собирали в 100 мкл подвижной фазы А, центрифугировали в течение 10 мин при 10.000 g и 20 мкл супернатанта вводили в систему ЖХ-МС / МС.

Экстракционный раствор, содержащий ВС, готовили путем добавления 75 мкл стокового раствора ВС (10 мг/л) к 25,0 мл метанола. Затем 1,0 мл

этого раствора добавляли к раствору метанол/ацетонитрил (80/20), в результате чего общий объем составлял 10,0 мл.

Вырезанный диск добавили 200 мкл раствора. Далее центрифугировали при 10000×g в течение 30 минут. Экстракты переносили в другие пробирки перемешивали на вортексе в течение 5 секунд.

Твердофазная экстракция

Ранее был разработан метод количественного определения ивабрадина, используя в качестве пробоподготовки твердофазную экстракцию¹. Подготовка биологических проб к исследованию осуществлялась с помощью: натрия цитрата пятиводного $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, «ОСЧ» (Россия); метанолом для ВЭЖХ (Fisher Scientific, Великобритания); манифолда для твердофазной экстракции ISOLUTE VacMaster-10 (Biotage, Швеция); концентрирующих патронов для твердофазной экстракции ISOLUTE CN, 100 мг сорбента / 1 мл объем патрона (Biotage, Швеция); натрия гидроксид NaOH, «ОСЧ» (Россия); рН метр S220 (METLER TOLEDO, Китай).

2.2 Валидация методик

Валидацию биоаналитической методики проводили по следующим показателям: стабильность, селективность, линейность, правильность, прецизионность, матричный эффект, а также по специфическим показателям, характерным только для метода «высушенной капли»: эффект объёма капли, эффект гематокрита, однородность капли.

Для валидации линейности необходимо 8 калибровочных стандартов разной концентрации, которые охватывали бы весь концентрационный

¹ Толкачев, Б. Е. Ивабрадин как субстрат-маркер активности изофермента CYP3A4 : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Толкачев Борис Евгеньевич, 2013. – 104 с. – EDN VIMGNI

диапазон валидируемой методики [147]. Экспериментально рассчитанные концентрации градуировочных стандартов должны лежать в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений (за исключением нижнего предела количественного определения, для которых эти значения могут находиться в пределах $\pm 20\%$). Этому критерию должны соответствовать не менее 75% градуировочных стандартов в не менее чем 6 различных концентрациях [147].

Правильность и прецизионность валидируется с помощью образцов контроля качества на 4 уровнях концентрации, анализируя по 5 образцов на каждом уровне. Правильность оценивается по величине процентной меры правильности и рассчитывается как:

$$\frac{\text{полученное значение}}{\text{истинное значение}} \cdot 100\% \quad (1)$$

Среднее значение рассчитанных концентраций должно находиться в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений для образцов контроля качества; для НПКО пределы допускаются расширить до $\pm 20\%$ от номинальных значений.

Прецизионность, выражающаяся в виде относительного стандартного отклонения (коэффициента вариации), рассчитывается как:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n}}}{\bar{X}} \quad (2)$$

Где:

σ – средне квадратическое отклонение.

\bar{X} – среднее значение рассчитанных концентраций образцов контроля качества.

n – количество анализируемых образцов.

X – рассчитанная концентрация образца контроля качества.

Относительное стандартное отклонение между циклами не должно превышать 15 % для образцов для образцов контроля качества, для НПКО оно не должно превышать 20 %.

Селективность валидируется путем анализа 6 холостых образцов и 6 образцов нижнего предела количественного определения. Площадь пиков в области времени удерживания аналита не должно превышать 20% от НПКО [111].

Стабильность оценивается путем анализа образцов контроля качества на двух уровнях концентрации при комнатной температуре в течение двух часов, 1-ой недели и 2-х недель. Для каждой временной точки проводится 5 серий анализов. Стабильность анализируемого вещества в исследуемом образце оценивают, используя образцы нижнего и верхнего уровня концентрации для образцов контроля качества, которые исследуют сразу после их пробоподготовки и после хранения в условиях, в которых проводится работа с испытуемыми образцами. Образцы для качества, как правило, анализируют по градуировочной кривой, рассчитанной по свежеприготовленным градуировочным растворам. Полученные концентрации сравнивают с номинальными. Правильность для каждой из концентраций (для средних значений) должна находиться в пределах $\pm 15\%$ от номинального значения [147].

Для оценки стабильности использовали образцы DBS на уровнях QCL и QCN, которые хранили в течение 14 дней при 22 и 45 °С. При этом образцы были проанализированы в трех временных точках 1, 7 и 14 дней вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивали со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов контроля качества. На их основе рассчитывался модуль разницы по формуле:

$$\% = \frac{\text{Ср. конц. образца при хранении} - \text{Ср. конц. свежеприг. образца}}{\text{Ср. конц. свежеприг. образца}} \cdot 100$$

Разница по полученным результатам не должна превышать 15%.

Для оценки влияния эффекта объёма капли необходимо было провести анализ 3-х разных объёмов (10, 40, 70 мкл) при среднем уровне гематокрита (0,4), на 2-х уровнях концентрации в 5 сериях [147].

Эффект гематокрита следует оценивать для 3-х уровней гематокрита (0,3; 0,4; 0,5), при 2 концентрационных уровнях в 5 сериях. Относительная погрешность рассчитанных концентраций не должна превышать — 15% от полученных значений при среднем уровне гематокрита.

При валидации однородности капли сравнивали результаты двух уровней концентраций образцов контроля качества на трех различных уровнях гематокрита, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и у края. Анализ проводился в 5 сериях. При этом относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не должна превышать 15% [147].

2.3 Статистические методы и анализ данных

Уровень согласованности между разработанным ВЭЖХ-МС/МС методом для способа «высушенной капли крови» и традиционным методом ВЭЖХ-МС/МС со стандартным способом пробоподготовки исследовали с использованием графиков Бланда-Алтмана. Средние значения и стандартные отклонения рассчитывали с помощью программы Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США).

Для сравнения были использованы образцы «высушенной капли крови» полученные от новорожденных из ГУЗ Клинической больницы №5 отдела неонатологии.

Среднее значение (d) и стандартное отклонение (s) разницы между двумя совпадающими показаниями рассчитывали для определения эквивалентности двух методов. При этом более 95% рассчитанных средних концентраций между двумя методами должны попадать в пределы $d-2s$ и

$d+2s$, чтобы подтвердить пригодность аналитического метода DBS для анализа образцов пациентов.

Обработка полученных данных производилась с использованием программно-статистической среды R 3.6.1 в программе RStudio 1.2, а также специализированного программного обеспечения Sciex Analyst 1.6.2. Во время работы системы полученные данные отправлялись в программное обеспечение Analyst, где отображались в виде полных масс-спектров, интенсивности одиночных или множественных ионов в зависимости от времени или общего ионного тока в зависимости от времени

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Разработка протоколов отбора и хранения образцов с помощью метода «высушенной капли крови»

В настоящее время такие организации как Международная ассоциация терапевтического мониторинга лекарственных средств и клинической токсикологии (International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology) и управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов на территории Соединенных Штатов Америки (Food and Drug Administration, FDA) работают над разработкой общих руководств по взятию, хранению, анализу и валидации технологии «высушенной капли», описывая не только валидационные параметры характерные для стандартных способов пробоподготовки и традиционных матриц (табл. 3), но и специфические параметры, характерные только для этой новой технологии (табл. 4) [3, 65, 194].

Таблица 3. Стандартные параметры валидации методов количественного определения лекарственных препаратов.

Валидационные параметры	Проводимые испытания	Критерии приемлемости
Линейность	8 калибровочных образцов + холостая проба + нулевая проба	$\leq 15\%$ от номинальных значений ($\leq 20\%$ для НПКО), не менее чем для 75% образцов.
Селективность	6 холостых образцов и 6 НПКО	$\leq 20\%$ от НПКО

Правильность	5 образцов контроля качества на 4-х концентрационных уровнях	$\leq 15\%$ от номинальных значений ($\leq 20\%$ для НПКО)
Прецизионность	5 образцов контроля качества на 4-х концентрационных уровнях	$\leq 15\%$ от номинальных значений ($\leq 20\%$ для НПКО)
Стабильность	5 образцов контроля качества на 2-х уровнях концентрации при комнатной температуре в течение двух часов, 1-ой недели и 2-х недель.	$\leq 15\%$ от номинальных значений
НПКО - нижний предел количественного определения,		

Таблица 4. Специфические параметры валидации методов количественного определения лекарственных препаратов.

Валидационный параметр	Проводимые испытания	Критерии приемлемости
Эффект объёма капли	5 образцов контроля качества на 3-х значениях объёма капли (10, 40, 70 мкл) при 3-х уровнях гематокрита (0,3; 0,4; 0,5), на 2-х уровнях концентрации	$\leq 15\%$ от номинальных значений
Эффект гематокрита	5 образцов контроля качества для 3-х уровней гематокрита, при 2 концентрационных уровнях	$\leq 15\%$ от номинальных значений
Однородность капли	Сравниваются 5 образцов контроля качества на 2-х уровнях концентраций образцов контроля качества при 3-х уровнях гематокрита, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и у края.	$\leq 15\%$ от номинальных значений

Таблица 5. Таблица сравнения объёма анализируемых образцов для валидации методов количественного определения лекарственных препаратов с использованием технологии “высушенной капли” и стандартных способов пробоподготовки

Валидационный параметр	Объем анализируемых образцов используя метод «высушенной капли крови»	Объем анализируемых образцов используя стандартные методы пробоподготовки
Линейность	$N=8(ГО)+1(ХО)+1(НО)=10$	$N=8(ГО)+1(ХО)+1(НО)=10$
Селективность	$N=6(ХО)+6(НПКО)=12$	$N=6(ХО)+6(НПКО)=12$
Правильность	$N=4(КК) \cdot 5(У)=20$	$N=4(КК) \cdot 5(У)=20$
Прецизионность	$N=4(КК) \cdot 5(У)=20$	$N=4(КК) \cdot 5(У)=20$
Стабильность	$N=3(КК) \cdot 2(У) \cdot 5(ВТ)=30$	$N=7(КК) \cdot 2(У) \cdot 5(ВТ)=70$
Эффект объёма капли	$N=3(О) \cdot 3(Г) \cdot 2(У) \cdot 5(КК)=90$	-
Эффект гематокрита	$N=3(Г) \cdot 2(У) \cdot 5(КК)=30$	-
Однородность капли	$N=2(ЦК) \cdot 3(Г) \cdot 2(У) \cdot 5(КК)=60$	-
Итого	272	108

*N-общее количество образцов; ГО-градуировочные образцы; ХО-холостой образец; НО-нулевой образец; НПКО-нижний предел количественного определения; КК-образцы контроля качества; У-концентрационные уровни; Г-уровни гематокрита; ВТ-количество временных точек; О-низкий, средний, высокий объём капли, МВ-вырез по центру, с края.

3.1 Разработка ВЭЖХ-МС/МС метода количественного определения ивабрадина

В процессе литературного поиска было отмечено несколько различных подходов к детектированию исследуемого вещества. На основании опубликованных данных в процессе разработки методики были оценены различные способы детектирования, в том числе различные способы ионизации при масс-спектрометрическом детектировании. [88]

Разработка метода количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ивабрадина и N-десметилированного стандарта включала определения оптимальных параметров хроматографического разделения, а также последующей масс-спектрометрической детекции. В качестве метода ионизации был использован электроспрей (ESI). Детекция ионов проводилась в режиме положительной полярности. [58, 169, 161]

Ионы-«предшественники» ивабрадина соответствовали частицам с m/z 469, ионы-«предшественники» N-десметиливабрадина – m/z 455. Для построения метода мониторинга множественных реакций (MRM) использовались ионные переходы, соответствующие наибольшей интенсивности ионов-«продуктов». Было установлено, что оба вещества в ходе диссоциации в камере соударений дают по два наиболее интенсивных иона-«продукта»: m/z 262,2 и 177,1 для ивабрадина (Рис. 3). При создании количественного MRM-метода с целью повышения специфичности были использованы оба ионных перехода.

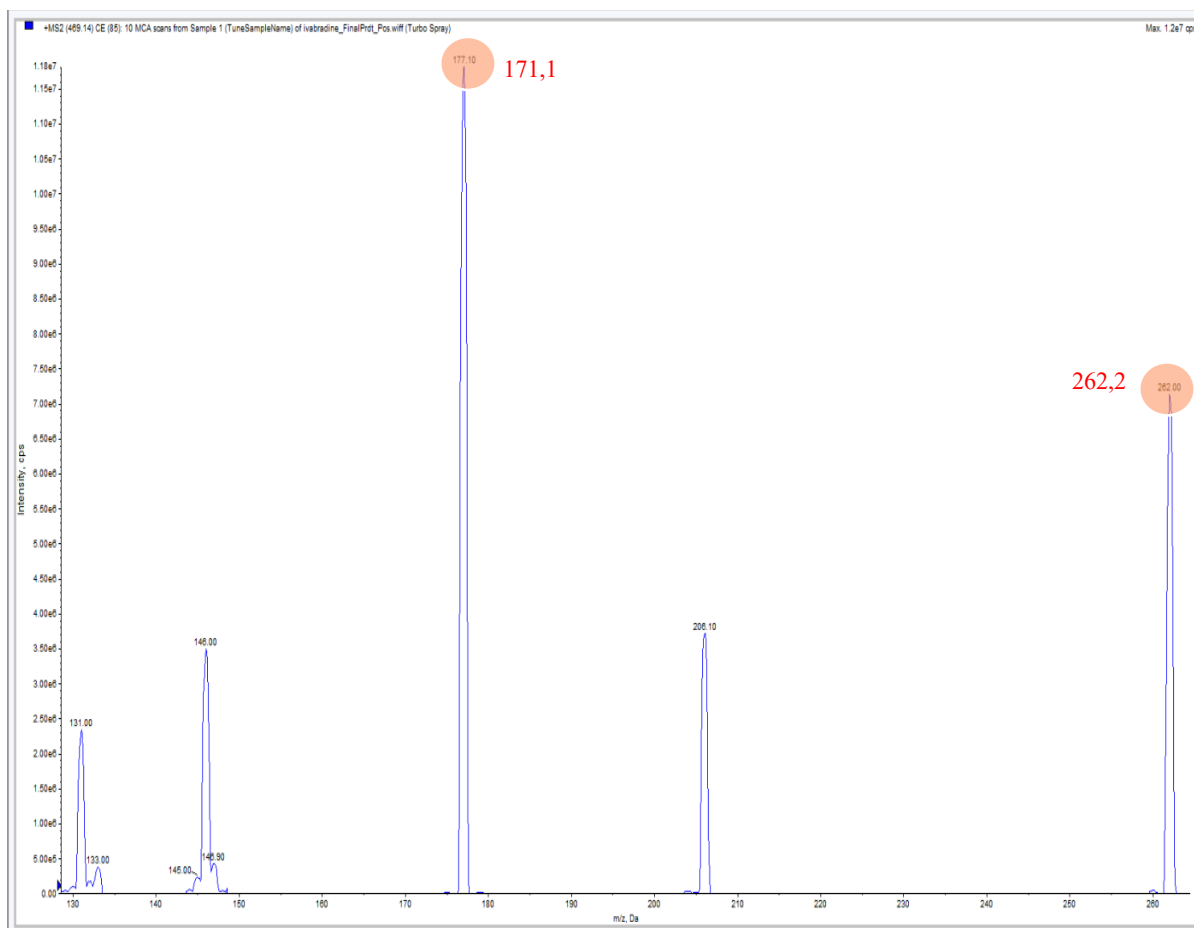


Рисунок 3. Масс-спектр ивабрадина в плазме крови: по оси абсцисс – время m/z (Da), по оси ординат – интенсивность сигнала.

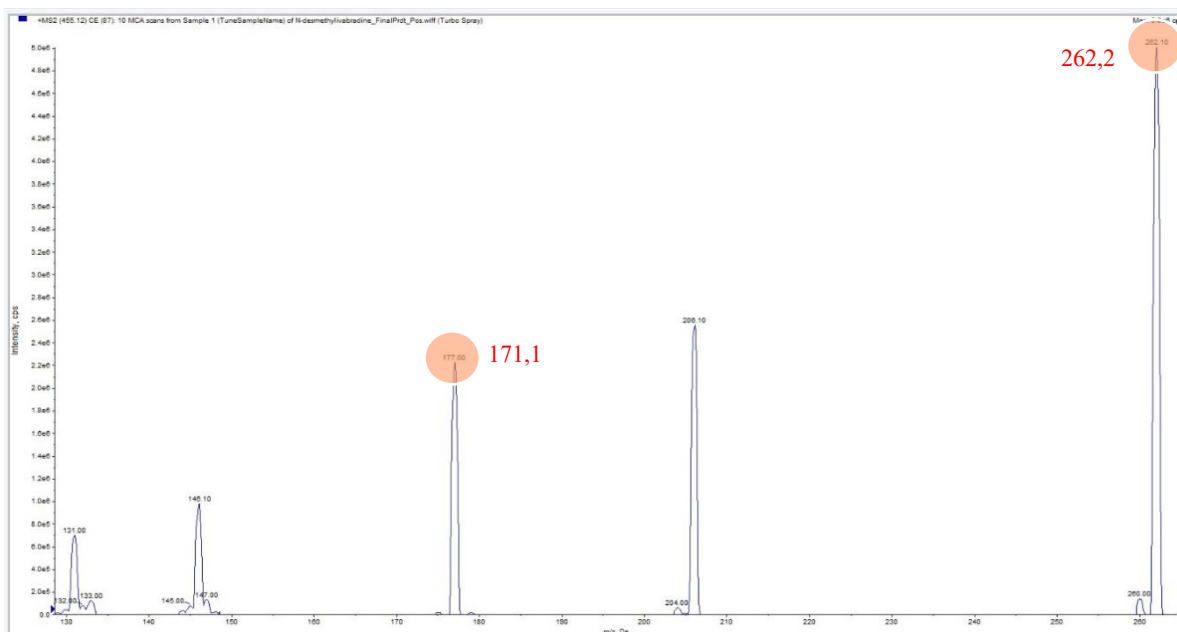


Рисунок 4. Масс-спектр N-десметиливабрадина в плазме крови: по оси абсцисс – время m/z (Da), по оси ординат – интенсивность сигнала.

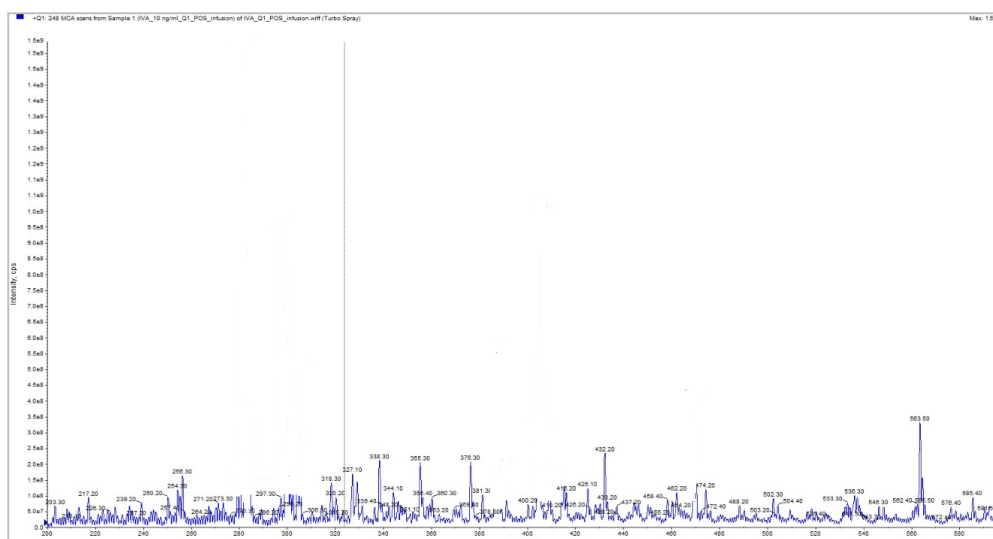


Рисунок 5. Масс-спектр плазмы крови. по оси абсцисс – время m/z (Da), по оси ординат – интенсивность сигнала.

В ходе оптимизации условий хроматографического разделения был выбран градиентный режим элюирования. Мобильная фаза представляла собой смесь вода/ацетонитрил в соотношении 70/30 при скорости потока 0,6 мл/мин до 0,5 минуты, после чего происходило постепенное изменение до соотношения 0/100 вода/ацетонитрил, которое было достигнуто на 2 минуте. На 3 минуте соотношение было изменено на первоначальное, и при этом соотношении происходило уравнивание системы до 5 минут. 0.1% раствор муравьиной кислоты добавляли, как в водную, так и в органическую составляющую мобильной фазы. Использование муравьиной кислоты позволяет повысить степень ионизации изучаемых соединений, тем самым увеличивая чувствительность анализа. Время удерживания ивабрадина в плазме крови и в образцах «высушенной капли крови» составило 1,65-1,86 мин (Рис. 6).

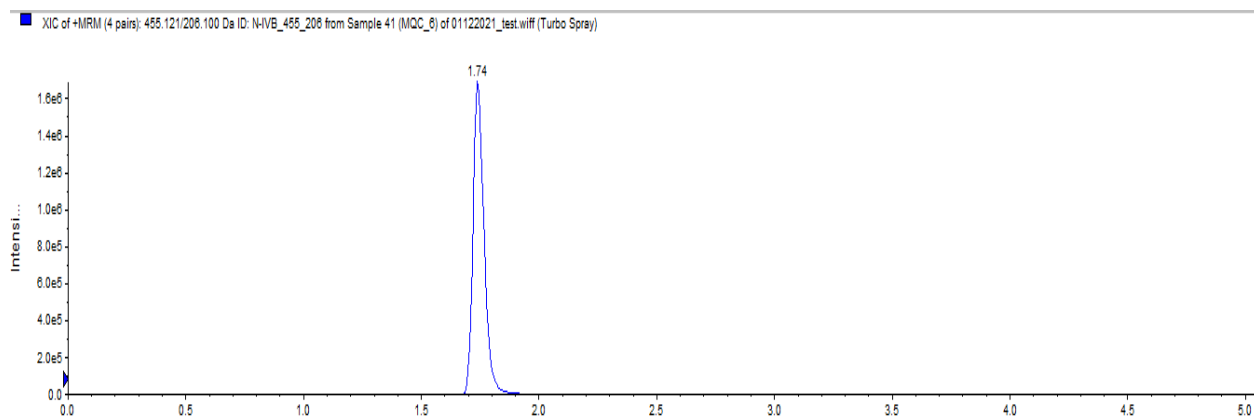


Рисунок 6. Хромато-масс-спектрограмма ивабрадина в плазме крови: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

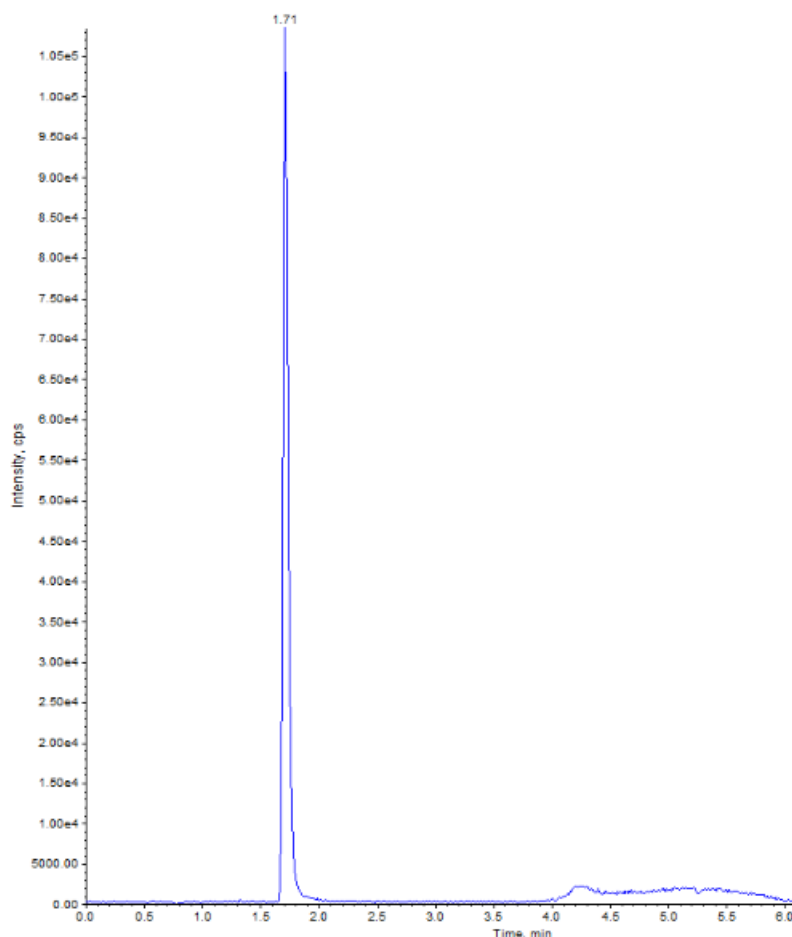


Рисунок 7. Хромато-масс-спектрограмма N-десметиливабрадина в плазме крови: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

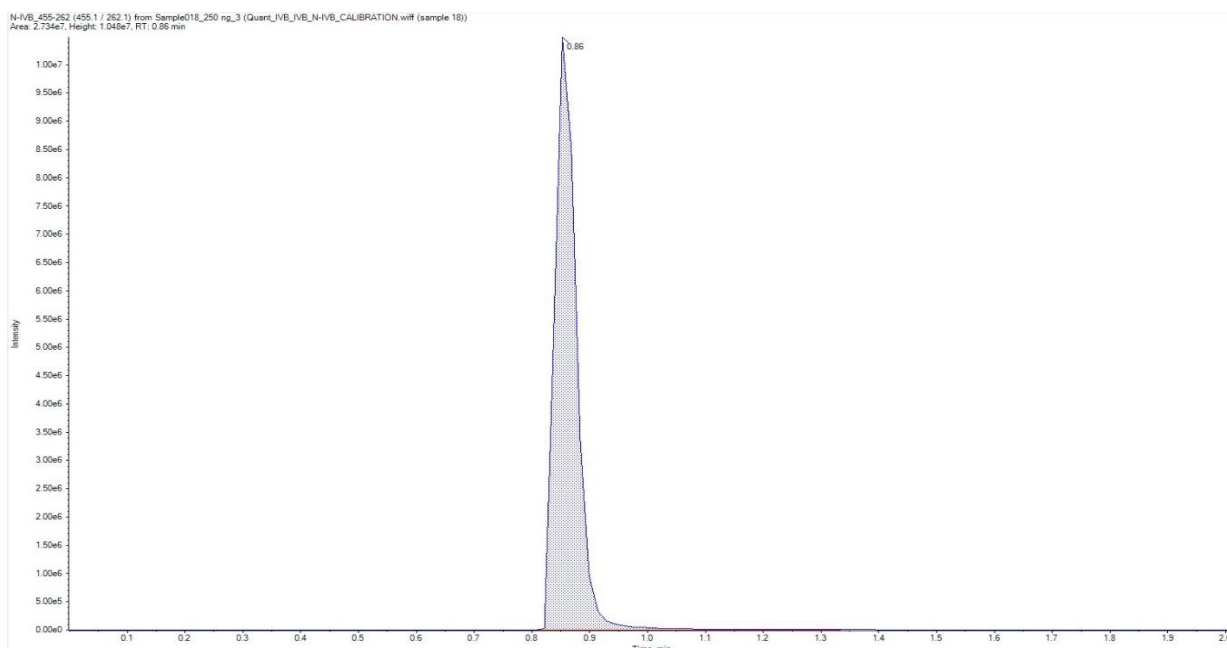


Рисунок 8. Хромато-масс-спектрограмма домперидона в плазме крови: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

3.2 Валидация ивабрадина в плазме крови

В ходе валидации разработанного метода были установлены основные валидационные параметры: линейность, точность, правильность, чувствительность (нижний предел количественного определения). Разработанная методика подтвердила свою линейность в диапазоне концентраций от 1 до 1 000 нг/мл при использовании взвешенного коэффициента $1/x^2$, при этом $r^2 > 0,99$ (рис 9). Коэффициент вариации (%), рассчитываемый при определении меж- и внутрисуточных точности не превышал 15% для основного диапазона концентраций [39].

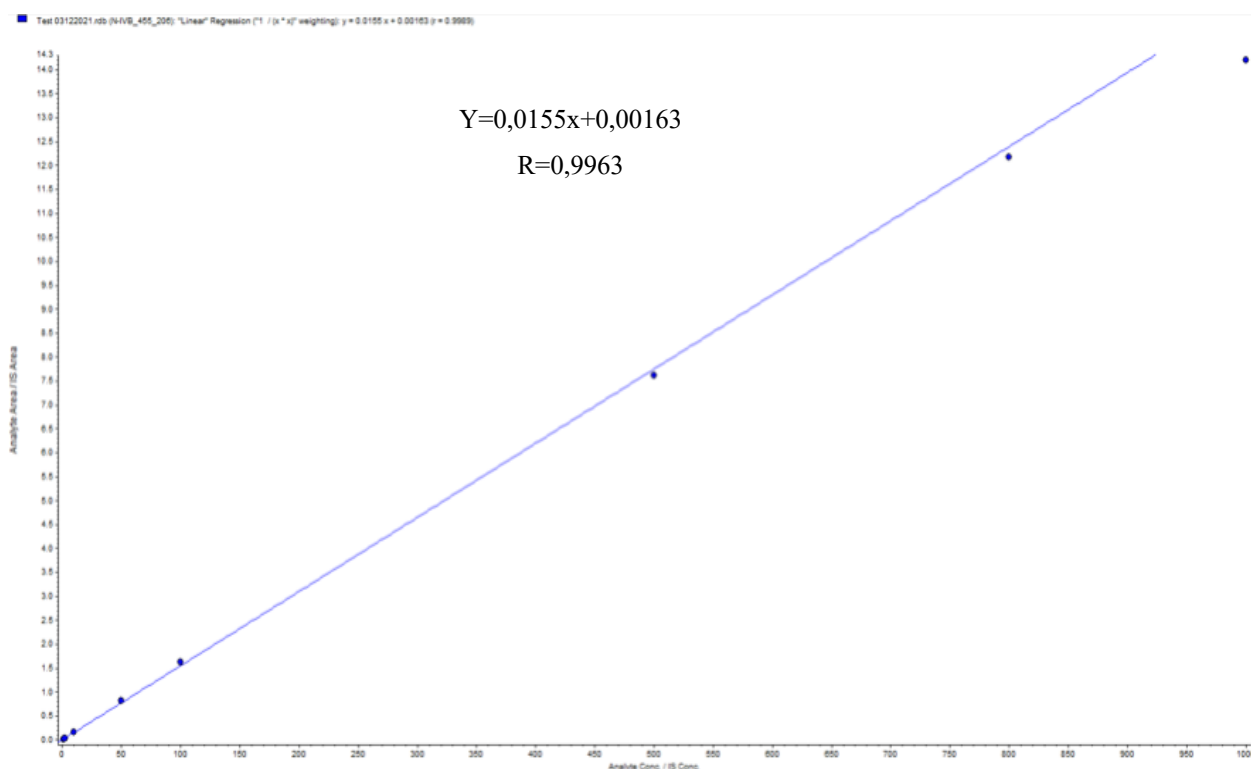


Рисунок 9. Калибровочная кривая ивабрадина в плазме крови добровольцев: по оси абсцисс – С (нг/мл), по оси ординат - AreaAnalyte/AreaIS.

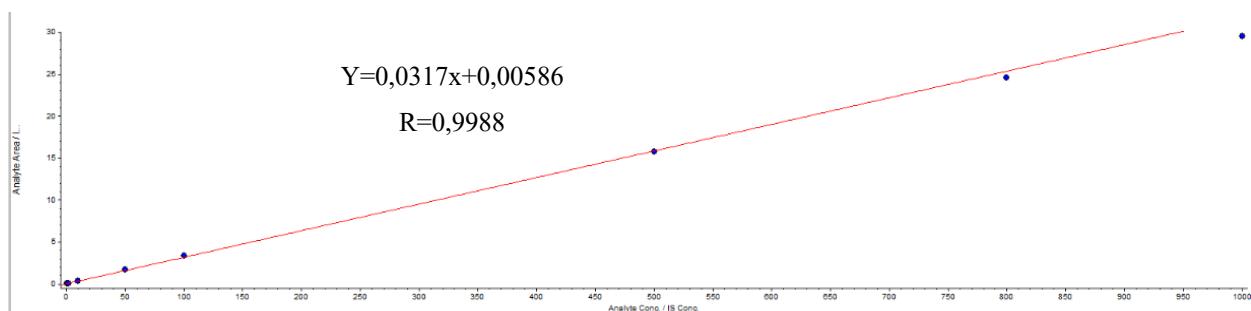


Рисунок 10. Калибровочная кривая N-десметиливабрадина в плазме крови добровольцев: по оси абсцисс – С (нг/мл), по оси ординат - AreaAnalyte/AreaIS.

Нижний предел количественного определения методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация ивабрадина в плазме

крови в аналитическом диапазоне, для которого возможно количественное определение ивабрадина со значениями относительного стандартного отклонения не более 20 %. Нижний предел количественного определения методики составил 1,00 нг/мл (Табл. 6).

Таблица 6. Таблица валидационных параметров количественного определения ивабрадина для метода с использованием в качестве пробоподготовки преципитацию белков.

Параметр		Значение			
		QCLOQ (1 нг/мл)	QCL (3 нг/мл)	QCM (400 нг/мл)	QCH (750 нг/мл)
Прецизионность (CV %)	Внутри цикла	11,4	6,6	1,6	4,1
	Между циклами	10,5	7,8	5,1	6,0
Правильность (%)	Внутри цикла	102,8	97,5	96,2	95,2
	Между циклами	100,5	99,4	96,5	94,3
Стабильность (%)		-	96,8	-	107,9
Селективность (%)		5,7	-	-	-
Коэффициент корреляции		0,99			

Таким образом, в ходе проведённого исследования были установлены оптимальные условия высокочувствительного и селективного количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ивабрадина в плазме крови человека.

Методика валидирована в соответствии с требованиями Евразийского экономического союза и Европейского агентства по лекарственным средствам и соответствует всем требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 1–1000 нг/мл в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики N-десметиливабрадина [90].

Предложенный метод количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ивабрадина может в дальнейшем использоваться для аналитической части исследований ивабрадина, прогнозирования нежелательных межлекарственных взаимодействий, а также при разработке алгоритмов коррекции режимов дозирования препаратов.

3.3 Валидация ивабрадина в образцах «высушенной капли крови»

Также была проведена валидация ВЭЖХ-МС метода количественного определения ивабрадина в образцах «высушенной капли крови».

Разработанная методика подтвердила свою линейность в диапазоне концентраций от 1 до 1000 нг/мл при использовании взвешенного коэффициента $1/x^2$, при этом $r^2 > 0,99$. Коэффициент вариации (%), рассчитываемый при определении меж- и внутрисуточных точности не превышал 15% для основного диапазона концентраций.

Нижний предел количественного определения методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация ивабрадина в образцах «высушенной капли крови» в аналитическом диапазоне, для которого возможно количественное определение ивабрадина со значениями относительного стандартного отклонения не более 20 %. Нижний предел количественного определения методики составил 1 нг/мл (Табл. 7).

Таблица 7. Таблица валидационных параметров для метода с использованием в качестве пробоподготовки «высушенную каплю крови».

Параметр		Значение			
		QCLOQ (1 нг/мл)	QCL (3 нг/мл)	QCM (400 нг/мл)	QCN (750 нг/мл)
Прецизионность (CV %)	Внутри цикла	9,4	8,0	7,5	11,4
	Между циклами	12,5	10,1	9,2	5,8
Правильность (%)	Внутри цикла	112,3	110,7	106,1	107,2
	Между циклами	91,2	100,7	95,9	96,3
Стабильность (%)		-	88,3	-	91,2
Селективность (%)		10,4	-	-	-
Коэффициент корреляции		0,99			

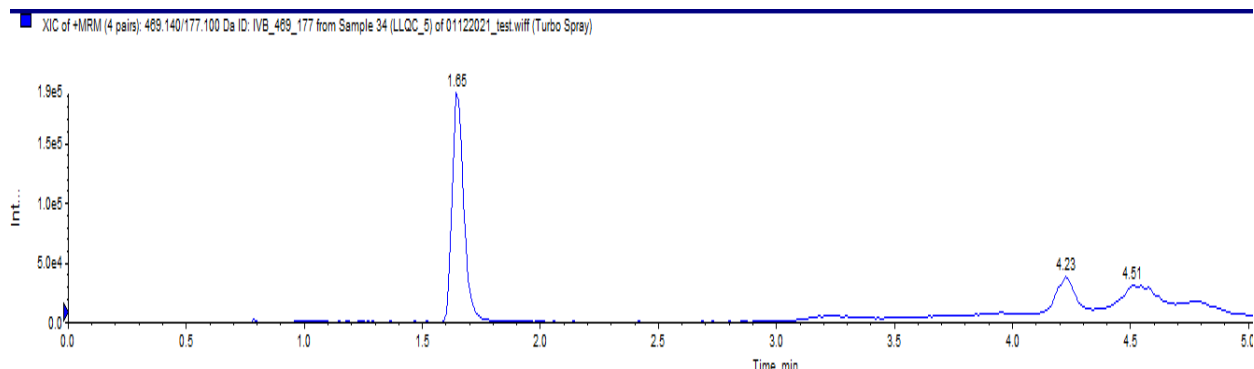


Рисунок 11. Хромато-масс-спектрограмма ивабрадина в образцах «высушенной капли крови»: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

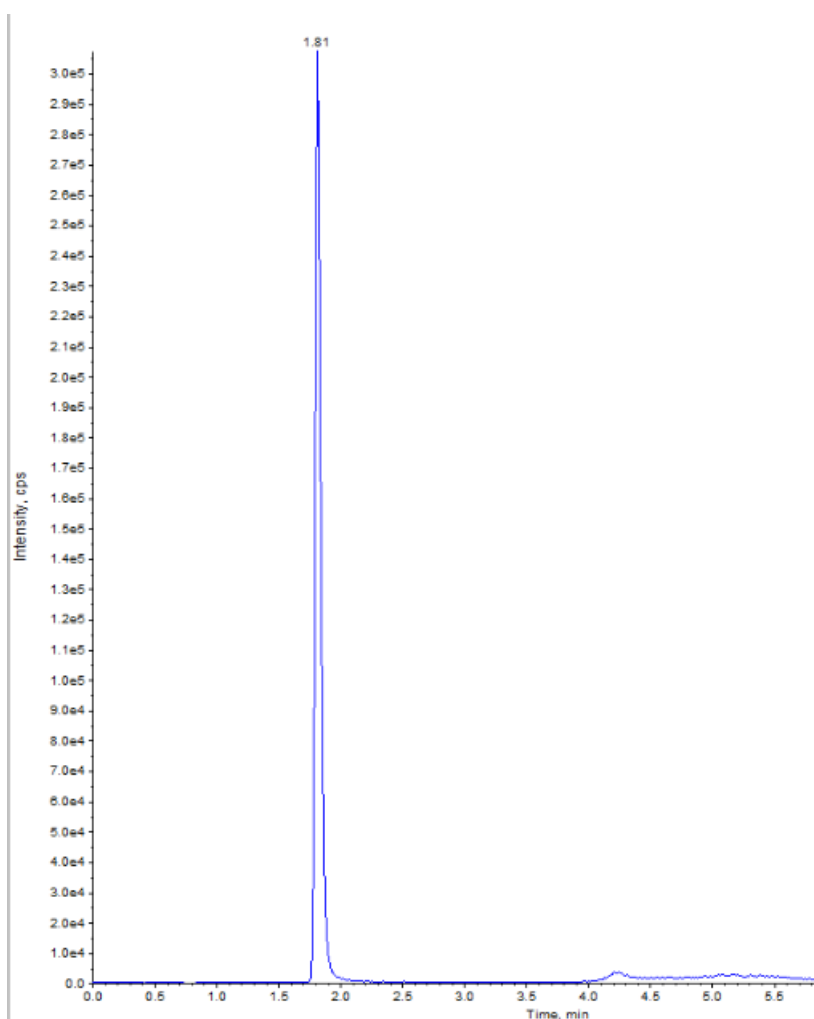


Рисунок 12. Хромато-масс-спектрограмма N-десметиливабрадина в образцах «высушенной капли крови»: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

Также для метода «высушенной капли крови» было оценено влияние специфических параметров нового метода на результаты анализа.

Влияние гематокрита оценивали на 3-х уровнях гематокрита (0,3; 0,4; 0,5), для QCL и QCN при этом полученные концентрации находились в диапазоне от 95,5 до 107,1% от номинальных (Табл. 8).

Таблица 8. Влияние гематокрита на результаты анализа.

Гематокрит %	QC	Номинальная концентрация	Точность (%)
--------------	----	--------------------------	--------------

		(нг/мл)	
0,3	LQC	3	113,7
	HQC	750	109,6
0,4	LQC	3	99,4
	HQC	750	105,1
0,5	LQC	3	95,5
	HQC	750	94,7

Для валидации эффекта объёма провели анализ 3-х объёмов (10, 40, 70 мкл) (30, 40 и 55 мкл) при среднем уровне гематокрита (0,4), на 2-х уровнях концентрации в 5 сериях. Относительная погрешность рассчитанных концентраций не превышала — 15% от полученных значений при среднем объёме.

При валидации однородности капли сравнили результаты образцов контроля качества при QCL и QCH, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и с края. Анализ проводился в 5 сериях. При этом относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не превышала 15% от номинальных.

Термическая стабильность была оценена при хранении образцов «высушенной капли» в течение 14 дней при температуре 22°C и 45 °C, как потенциально возможные температуры при хранении и транспортировке образцов. Для оценки стабильности использовали образцы DBS на уровнях QCL и QCH при этом образцы проанализированы в трех временных точках 1, 7 и 14 дней вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивались со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов контроля качества. При этом полученные значения по формуле X после 14 дней хранения находились в диапазоне от 87,2-93,8%.

Ранее на кафедре клинической фармакологии и интенсивной терапии ВолгГМУ был разработан и валидирован метод количественного определения ивабрадина и его N-деметилованного метаболита в биологических пробах с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии. Оценена возможность использования ивабрадина для изучения активности СYP3A4, а также изучена активности СYP3A4 с использованием разработанной методики фенотипирования у пациентов на фоне плановой терапии, включающей индукторы/ингибиторы данного изофермента в условиях клинической практики [21].

В данной работе установлено, что оптимальным соотношением компонентов мобильной фазы является 0,24/0,76. При этом рН буферного раствора составлял 4,8. Хроматографирование проводили при скорости потока 1 мл/мин. Среднее время удерживания для ивабрадина составило $8,0 \pm 0,21$ мин; для N-десметиливабрадина – $8,9 \pm 0,28$ мин, для домперидона (внутреннего стандарта) – $11,2 \pm 0,14$ мин. Таким образом, подобранные условия хроматографирования обеспечивали необходимую степень разделение пиков изучаемых при времени удерживания, приемлемом в условиях рутинного анализа (рис.13).

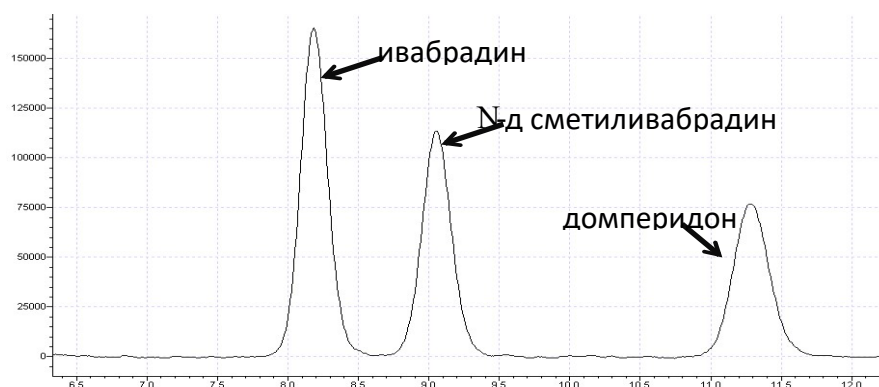


Рис.13 Пример хроматограммы, полученной при анализе рабочего раствора ивабрадина (250 нг/мл), N-десметиливабрадина (250 нг/мл) и домперидона (1000 нг/мл). По оси абсцисс – минуты, по оси ординат – единицы интенсивности эмиссии.

Таблица 9. Основные валидационные параметры биоаналитической методики количественного определения ивабрадина и его N-деметилированного метаболита.

Биопроба	C _{НОМ} , нг/мл	Прецизионность, %NOM		Точность, %CV		Предел количественного определения, нг/мл	
		Внутридневная	Меж- дневная	Внутридневная	Меж- дневная	Нижний	Верхний
Ивабрадин							
Плазма	5	41,33	46,66	129,74	54,29	10	250
	10	4,58	19,13	118,61	94,11		
	25	13,02	10,9	113,84	102,44		
	50	14,08	7,18	106,29	97,84		
	100	1,43	10,7	90,73	102,73		
	200	1,42	1,54	98,19	99,49		
	250	6,02	1,27	99,15	99,13		

Моча	25	10,75	11,04	119,74	113,56	25	100
	50	4,05	7,65		110,83		
	75	6,28	11,56	112,19	105,9		
	250	3,9	3,29	93,28	92,69		
	375	7,2	4,28	96,62	100,4		

					6		
	500	5,27	5,16	98	99,28		
	1000	2,12	3,22	100,38	100,02		
Плазма	5	67,56	11,46	5,64	-24,01	10	250
	10	10,95	3,86	80,31	82,39		
	25	18,77	7,52	85,5	94,64		
	50	14,61	6,54	108,55	101,78		
	100	5,31	6,59	107,26	108,35		
	200	2,78	1,51	101,52	100,57		
	250	4,47	2,98	100,46	100,71		
Моча	25	13,24	10,88	110,62	108,75	25	1000
	50	12,72	10,69	99,37	96,37		
	75	7,74	8,22	101,08	98,33		
	250	2,48	5,17	98,17	97,31		
	375	7,55	4,92	101,77	101,62		
	500	9,23	6,64	99,55	97		
	1000	5,7	3,64	100,43	98,99		

Примечание: $C_{\text{НОМ}}$ – номинальная концентрация; $\%CV$ – коэффициент вариации; $\%НОМ$ – процент от номинальной концентрации, который составляет концентрация, рассчитанная по уравнению регрессии.

Заключение. Изучение вклада различных индивидуальных факторов, влияющих на концентрацию лекарственного препарата в крови и дальнейший его фармакодинамический эффект необходимо при ТЛМ, что определяет значимость проведения фенотипирования.

Ранее уже проводилось фенотипирования СYP3A4 с использованием «ивабрадинового теста» для проведения мониторинга изменения активности данного изофермента у пациентов, получающих его индуктор, либо

ингибитор в составе плановой фармакотерапии. В данном исследовании был оптимизирован данный способ фенотипирования с использованием метода «высушенной капли крови».

При сравнении двух разработанных методов, было выявлено, что использование в качестве пробоподготовки метод «высушенной капли крови» в отличии от твердофазной экстракции позволяет снизить время анализа с 8,2 до 1,7 минут. Высушенная капля не требует дополнительного оборудования, более проста в применении и менее затратная по ресурсу и по времени.

Также увеличилась чувствительность анализа: нижний предел количественного определения с использованием твердофазной экстракции составил 10 нг/мл, тогда как с использованием «высушенной капли крови» и ВЭЖХ-МС/МС 1 нг/мл. При этом количество биообразца для нового метода составляет всего несколько капель цельной крови, при этом для ранее разработанной методики необходимо значительно большее количество плазмы крови. Данные преимущества метода «высушенной капли крови» в качестве пробоподготовки с использованием ВЭЖХ-МС/МС значительно упрощают проведение фенотипирования СYP3A4 с использованием «ивабрадинового теста» для проведения мониторинга изменения активности данного изофермента у пациентов, получающих его индуктор, либо ингибитор в составе плановой фармакотерапии.

3.4. Разработка ВЭЖХ-МС/МС метода количественного определения ванкомицина.

В процессе литературного поиска было отмечено несколько различных подходов к детектированию исследуемого вещества [132]. На основании опубликованных данных в процессе разработки методики были оценены различные способы детектирования, в том числе различные способы

ионизации при масс-спектрометрическом детектировании [11, 28, 105, 170, 176].

Разработка метода количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ванкомицина включала определения оптимальных параметров хроматографического разделения, а также последующей масс-спектрометрической детекции. В качестве метода ионизации был использован электроспрей (ESI). Детекция ионов проводилась в режиме положительной полярности [53,114,196,52,139].

Хроматографическое разделение компонентов проводили на колонке Poroshell 120 C18 (4,6 x 50 мм, 2,7 мкм). При разработке условий масс-спектрометрической детекции искоемых веществ методом мониторинга множественных реакций (MRM) были определены ионы-«предшественники» и соответствующие им ионы-«продукты». Ионы-«предшественники» ванкомицина соответствовали частицам m/z 725,3. Наиболее интенсивными ионами-«продуктами», зарегистрированными при фрагментации протонированных молекул в ячейке соударений, были частицы m/z 88,1 и m/z 387,9 для ванкомицина (Рис. 14). В ходе оптимизации условий хроматографического разделения был выбран изократический режим элюирования. Мобильная фаза представляла собой смесь ацетонитрил/вода в соотношении 80/20 при скорости потока 0,3 мл/мин. 0.1% раствор муравьиной кислоты добавляли, как в водную, так и в органическую составляющую мобильной фазы. [70] Время удерживания ванкомицина в плазме крови и в образцах «высушенной капли крови» составило 1,4-1,63 мин (Рис. 16), что позволяло сократить суммарное время анализа каждой пробы до 4 мин.

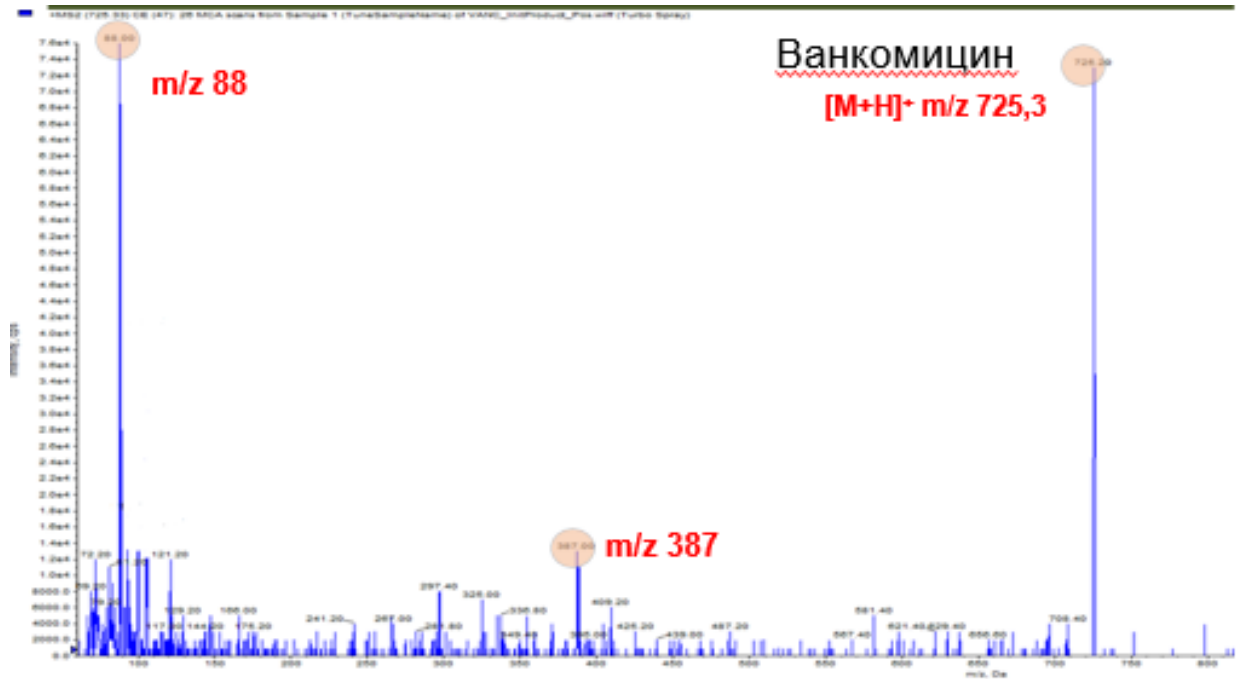


Рисунок 14. Масс-спектр ванкомицина в плазме крови: по оси абсцисс – время m/z (Da), по оси ординат – интенсивность сигнала.

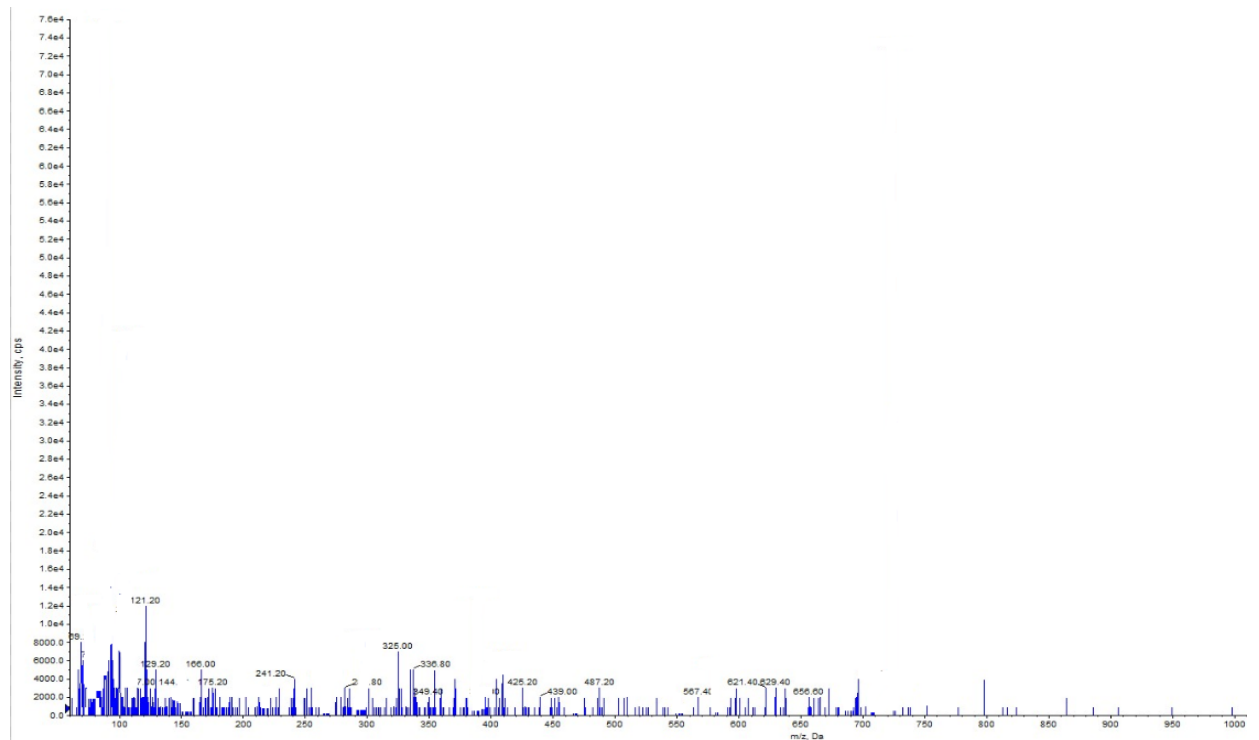


Рисунок 15. Масс-спектр плазмы крови. по оси абсцисс – время m/z (Da), по оси ординат – интенсивность сигнала.

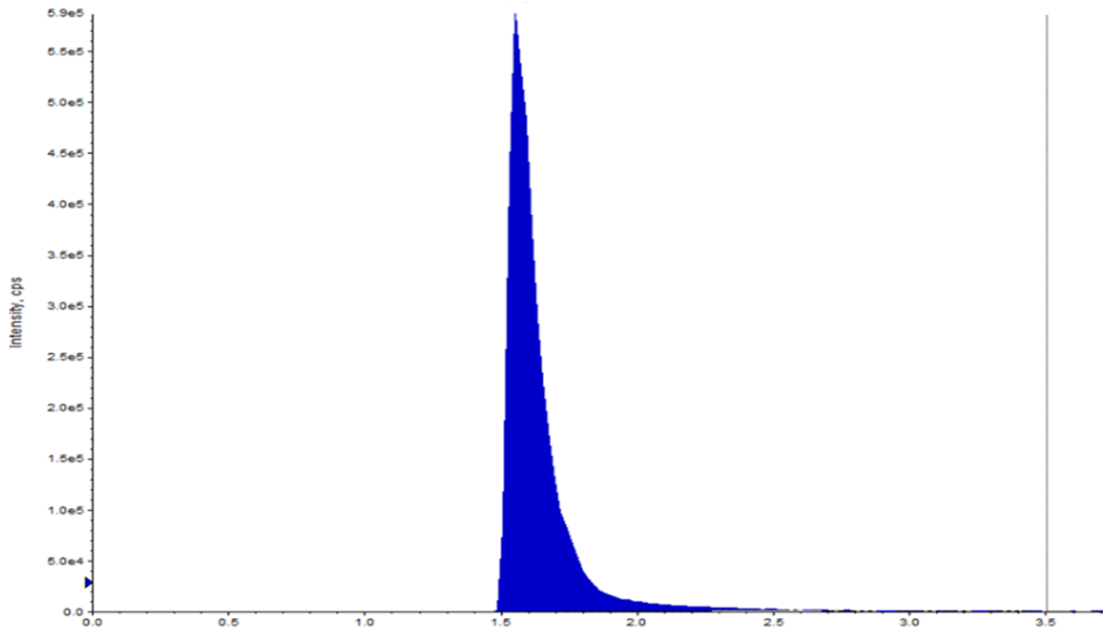


Рисунок 16. Хромато-масс-спектр ванкомицина в плазме крови: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

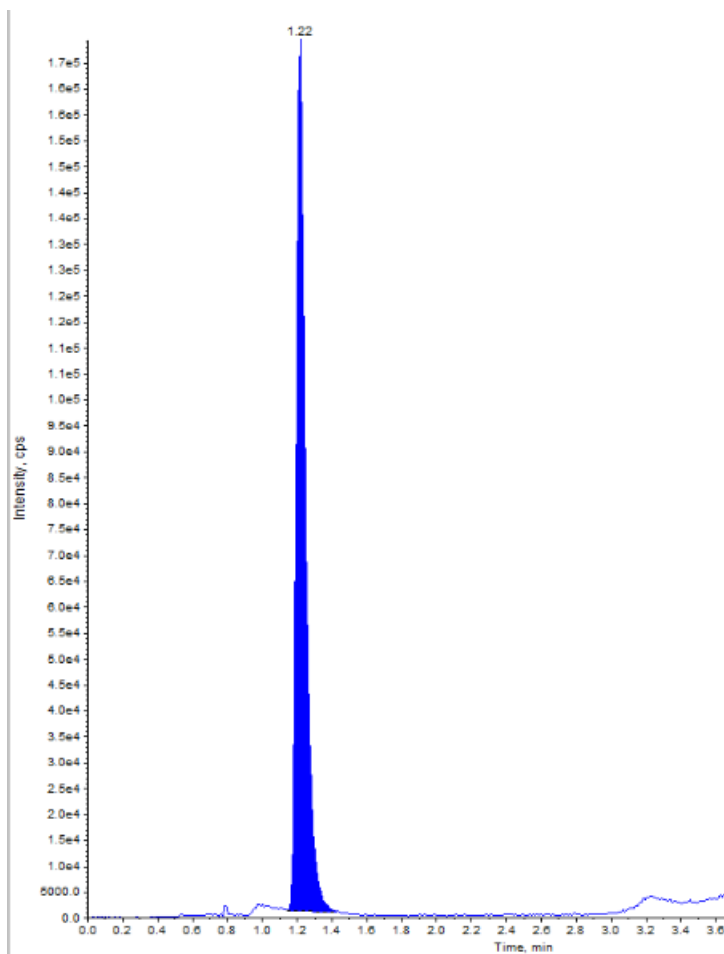


Рисунок 17. Хромато-масс-спектрограмма норванкомицина в плазме крови: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

3.5 Валидация ванкомицина в плазме крови

В ходе валидации разработанного метода были установлены основные валидационные параметры: линейность, точность, правильность, чувствительность (нижний предел количественного определения). Разработанная методика подтвердила свою линейность в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкг/мл при использовании взвешенного коэффициента $1/x^2$, при этом $r^2 > 0,99$. Коэффициент вариации (%), рассчитываемый при определении меж- и внутрисуточных точности не превышал 15% для основного диапазона концентраций.

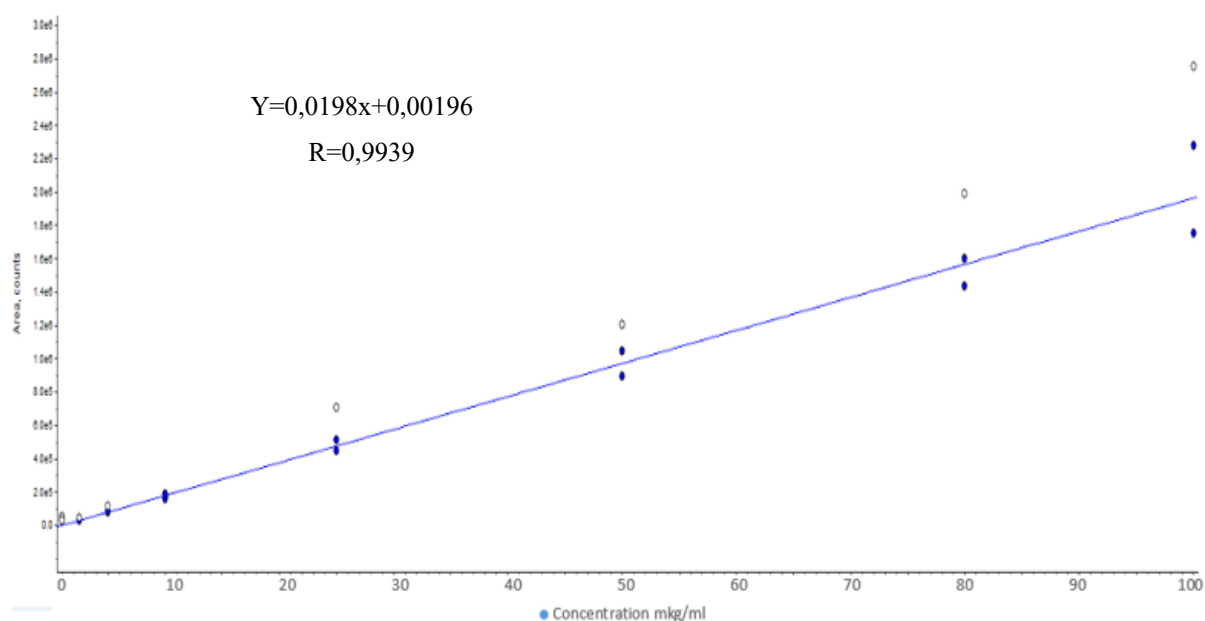


Рисунок 18. Калибровочная кривая ванкомицина в плазме крови добровольцев: по оси абсцисс – С (нг/мл), по оси ординат - AreaAnalyte/AreaIS.

Нижний предел количественного определения методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация ванкомицина в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которого возможно количественное определение ванкомицина со значениями относительного стандартного отклонения не более 20 %. Нижний предел количественного определения методики составил 1,00 мкг/мл (Табл. 10).

Таблица 10. Таблица валидационных параметров количественного определения ванкомицина для метода с использованием в качестве пробоподготовки преципитацию белков.

Параметр		Значение			
		QCLOQ (1 мкг/мл)	QCL (7,5 мкг/мл)	QCM (35 мкг/мл)	QCN (75 мкг/мл)
Прецизионность (CV %)	Внутри цикла	3,03	12,2	4,40	6,0
	Между циклами	17,8	13,5	8,03	7,64
Правильность (%)	Внутри цикла	115,0	99,5	93,1	106,6
	Между циклами	110,1	112,7	101,8	100,3
Стабильность (%)			96,8	-	108,2
Селективность (%)		3,03	-	-	
Коэффициент корреляции		0,989			

3.6 Валидация ванкомицина в образцах «высушенной капли крови»

Также была проведена валидация ВЭЖХ-МС метода количественного определения ванкомицина в образцах «высушенной капли крови».

Разработанная методика подтвердила свою линейность в диапазоне концентраций от 1 до 1 00 мг/мл при использовании взвешенного коэффициента $1/x^2$, при этом $r^2 > 0,99$. Коэффициент вариации (%), рассчитываемый при определении меж- и внутрисуточных точности не превышал 15% для основного диапазона концентраций.

Нижний предел количественного определения методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация ванкомицина в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которого возможно количественное определение ванкомицина со значениями относительного стандартного отклонения не более 20 %. Нижний предел количественного определения методики составил 1,00 мкг/мл (Табл. 11).

Таблица 11. Таблица валидационных параметров для метода с использованием в качестве пробоподготовки «высушенную каплю крови».

Параметр		Значение			
		QCLOQ (1 мкг/мл)	QCL (7,5 мкг/мл)	QCM (35 мкг/мл)	QCH (75 мкг/мл)
Прецизионнос	Внутри цикла	2,7	2,1	2,7	3,7

ть (CV %)	Между циклами	7,6	4,7	6,9	7,0
-----------	---------------	-----	-----	-----	-----

Правильность (%)	Внутри цикла	104,6	94,4	101,6	101,8
	Между циклами	91,3	95,1	103,2	107,6
Стабильность (%)		-	85,3	-	87,5
Селективность (%)		2,7	-	-	-
Коэффициент корреляции		0,99			

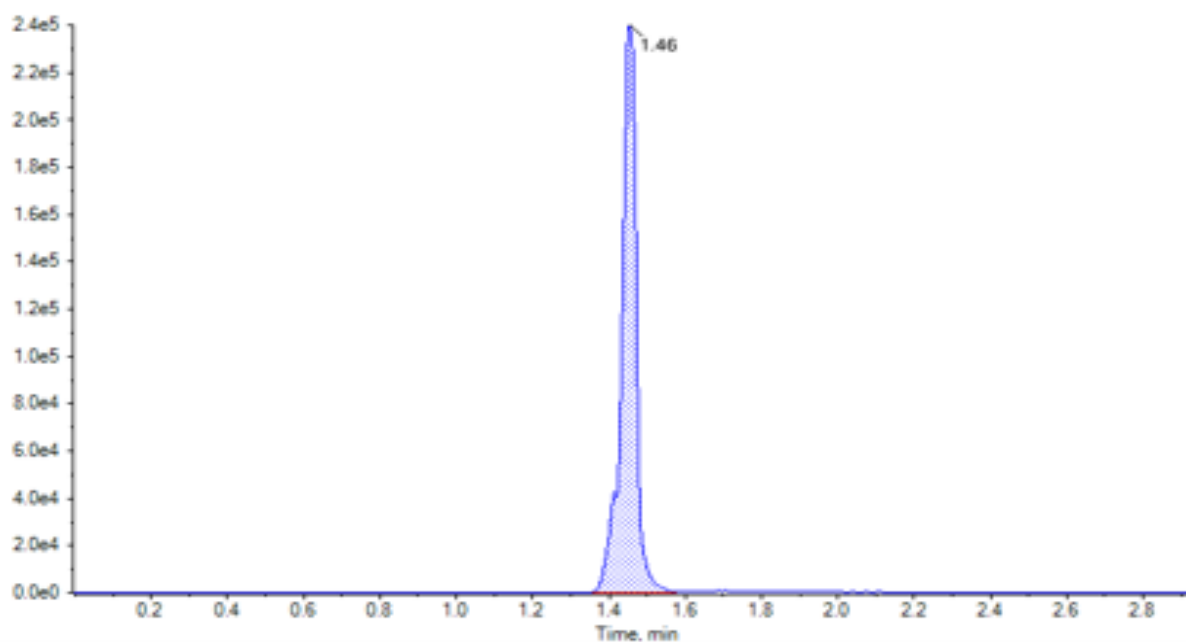


Рисунок 19. Хромато-масс-спектрограмма ванкомицина в «высушенной капле»: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

Также для метода «высушенной капли крови» было оценено влияние специфических параметров нового метода на результаты анализа.

Влияние гематокрита оценивали на 3-х уровнях гематокрита (0,3; 0,4; 0,5), для QCL и QCN при этом полученные концентрации находились в диапазоне от 94,3 до 105,8% от номинальных (Табл. 12).

Таблица 12. Влияние гематокрита на результаты анализа.

Гематокрит %	QC	Номинальная концентрация (мг/мл)	Точность (%)
0,3	LQC	7,5	94,3
	HQC	75	97,6
0,4	LQC	7,5	95,8
	HQC	75	98,1
0,5	LQC	7,5	95,6
	HQC	75	105,8

Для валидации эффекта объёма провели анализ 3-х объёмов (10, 40, 70 мкл) (30, 40 и 55 мкл) при среднем уровне гематокрита (0,4), на 2-х уровнях концентрации в 5 сериях. Относительная погрешность рассчитанных концентраций не превышала — 15% от полученных значений при среднем объёме.

При валидации однородности капли сравнили результаты образцов контроля качества при QCL и QCN, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и с края. Анализ проводился в 5 сериях. При этом относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не превышала 15% от номинальных.

Стабильность

Термическая стабильность была оценена при хранении образцов «высушенной капли» в течение 14 дней при температуре 22°C и 45 °C, как потенциально возможные температуры при хранении и транспортировке

образцов. Для оценки стабильности использовали образцы DBS на уровнях QCL и QCN при этом образцы проанализированы в трех временных точках 1, 7 и 14 дней вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивались со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов контроля качества. При этом полученные значения по формуле X после 14 дней хранения находились в диапазоне от 85,4-87,5%.[192]

Сравнительный анализ стандартных способов пробоподготовки и метода «высушенной капли крови»

Был проведен сравнительный анализ стандартного метода забора биообразцов и метода высушенной капли крови.

Уровень согласованности между разработанным ВЭЖХ-МС/МС методом для способа «высушенной капли крови» и традиционным методом ВЭЖХ-МС/МС с преципитацией белков в качестве пробоподготовки исследовали с помощью метода Бланда-Алтмана.

Метод позволяет провести сравнение результатов измерений, выполненных двумя разными способами. Суть состоит в том, что для каждой пары измерений вычисляются разность и среднее значение. Средняя разность, вычисленная для всех пар признаков в исследуемом наборе данных, характеризует систематическое расхождение показателей, наличие которого указывает на неполное соответствие результатов, полученных разными методами, а стандартное отклонение разностей – степень разброса результатов.

По нашим рекомендациям, для сравнения были использованы образцы «высушенной капли крови» полученные от новорожденных, для которых применялась терапия ванкомицином из ГУЗ Клинической больницы №5 отдела неонатологии.

Было произведено сравнение между значениями концентраций ванкомицина в образцах «высушенной капли крови» и образцах плазмы (Рис. 19).

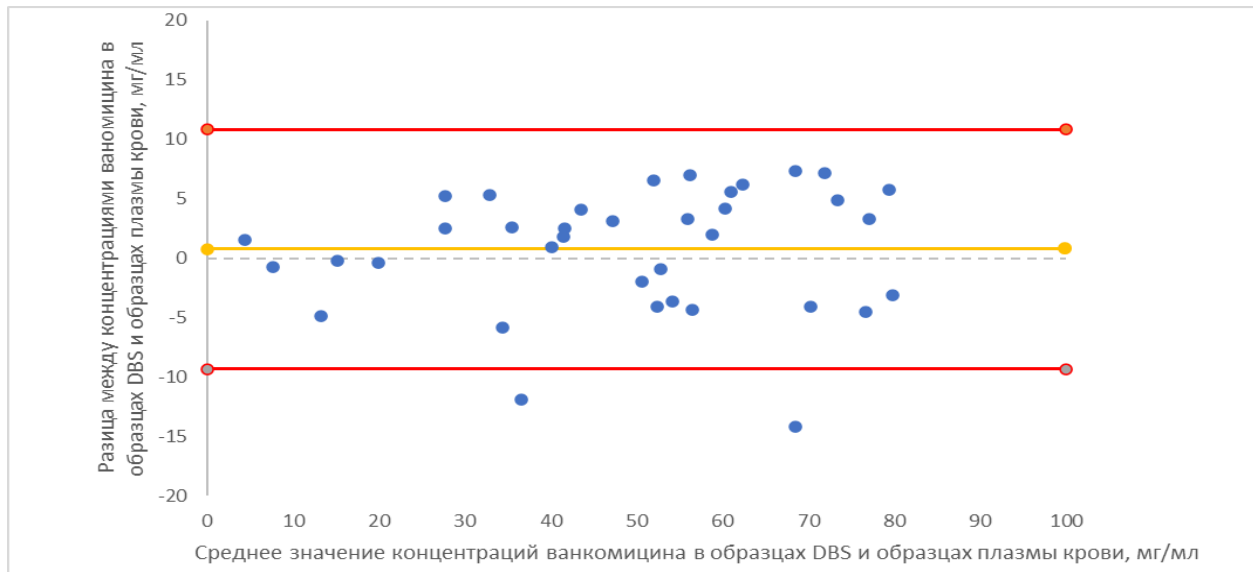


Рисунок 20. Сравнение двух методов пробоподготовки по Блэнду-Алтману для ванкомицина.

Среднее значение (d) и стандартное отклонение (s) разницы между двумя совпадающими показаниями рассчитывали для определения эквивалентности двух методов. При этом более 95% рассчитанных средних концентраций находятся в пределах $d-2s$ и $d+2s$, которые соответствуют значениям $-10,2$ и $12,2$, что подтверждает пригодность разработанного метода для анализа образцов пациентов.

Заключение: Разработанная методика количественного ВЭЖХ-МС/МС определения концентрации ванкомицина в образцах «высушенной капли крови» в отличие от разработанных ранее методик позволяет сократить время анализа с 8 до 2 минут. При этом все параметры валидации соответствовали критериям приемлемости. Образцы «высушенной капли крови» были стабильны в течение 14 дней при температуре 22°C и 45°C . Небольшой объем крови, сокращенное время анализа в сочетании с простотой аналитической методики позволяют сделать этот метод полезным для терапевтического лекарственного мониторинга ванкомицина в сложных

клинических случаях. Также проведенная оценка специфических параметров валидации, характерных для образцов «высушенной капли» не показала влияние этих параметров на результат анализа, что в ранних исследованиях не было доказано и ставило под сомнение использование разработанных методик в реальной клинической практике [98].

3.7 Разработка ВЭЖХ-МС/МС метода количественного определения пиперациллина.

В процессе литературного поиска было отмечено несколько различных подходов к детектированию исследуемого вещества. На основании опубликованных данных в процессе разработки методики были оценены различные способы детектирования, в том числе различные способы ионизации при масс-спектрометрическом детектировании. [91,79,47]

Разработка метода количественного ВЭЖХ-МС/МС определения пиперациллина включала определения оптимальных параметров хроматографического разделения, а также последующей масс-спектрометрической детекции. В качестве метода ионизации был использован электроспрей (ESI). Детекция ионов проводилась в режиме положительной полярности [27, 81, 85].

Хроматографическое разделение компонентов проводили на колонке Poroshell 120 C18 (4,6 x 50 мм, 2,7 мкм). При разработке условий масс-спектрометрической детекции искоемых веществ методом мониторинга множественных реакций (MRM) были определены ионы-«предшественники» и соответствующие им ионы-«продукты». Ионы-«предшественники» пиперациллина соответствовали частицам m/z 518,2 соответственно. Наиболее интенсивными ионами-«продуктами», зарегистрированными при фрагментации протонированных молекул в ячейке соударений, были частицы и m/z 143,1, m/z 115,0 для пиперациллина (Рис. 20). В ходе оптимизации условий хроматографического разделения был выбран

изократический режим элюирования. Мобильная фаза представляла собой смесь ацетонитрил/вода в соотношении 80/20 при скорости потока 0,3 мл/мин. 0.1% раствор муравьиной кислоты добавляли, как в водную, так и в органическую составляющую мобильной фазы. При этих условиях время удерживания пиперациллина в плазме крови и в образцах «высушенной капли крови» составило 1,63-1,86 мин (Рис. 21).

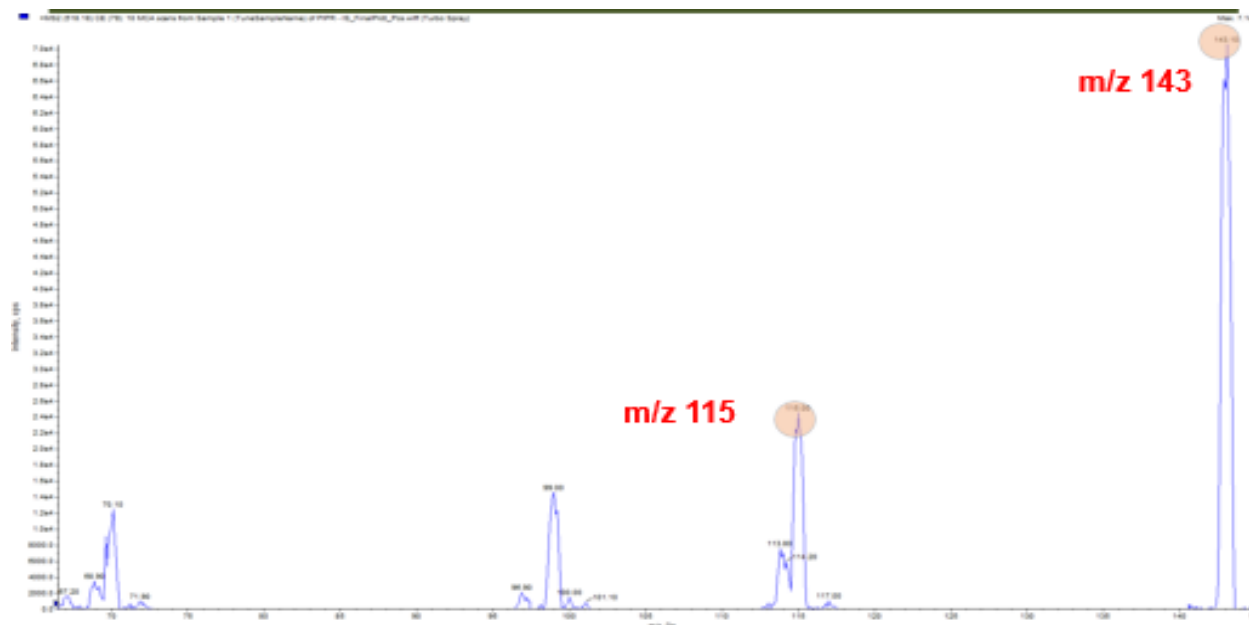


Рисунок 21. Масс-спектр пиперациллина в плазме крови: по оси абсцисс – время m/z (Da), по оси ординат – интенсивность сигнала.

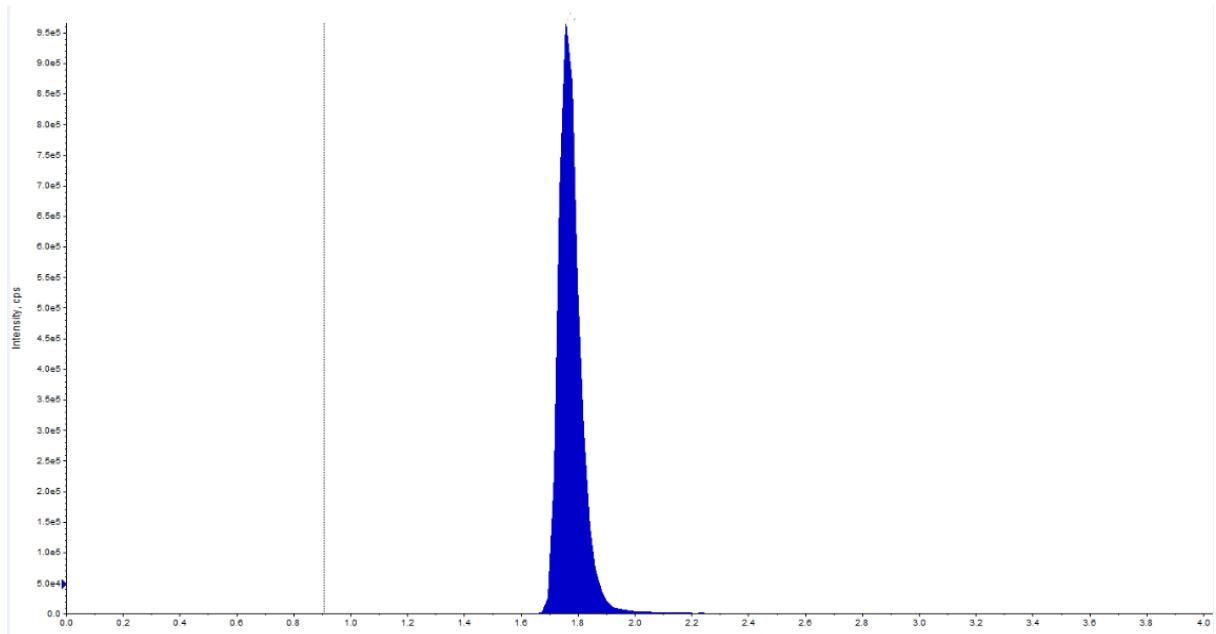


Рисунок 22. Хромато-масс-спектр пиперациллина в плазме крови: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

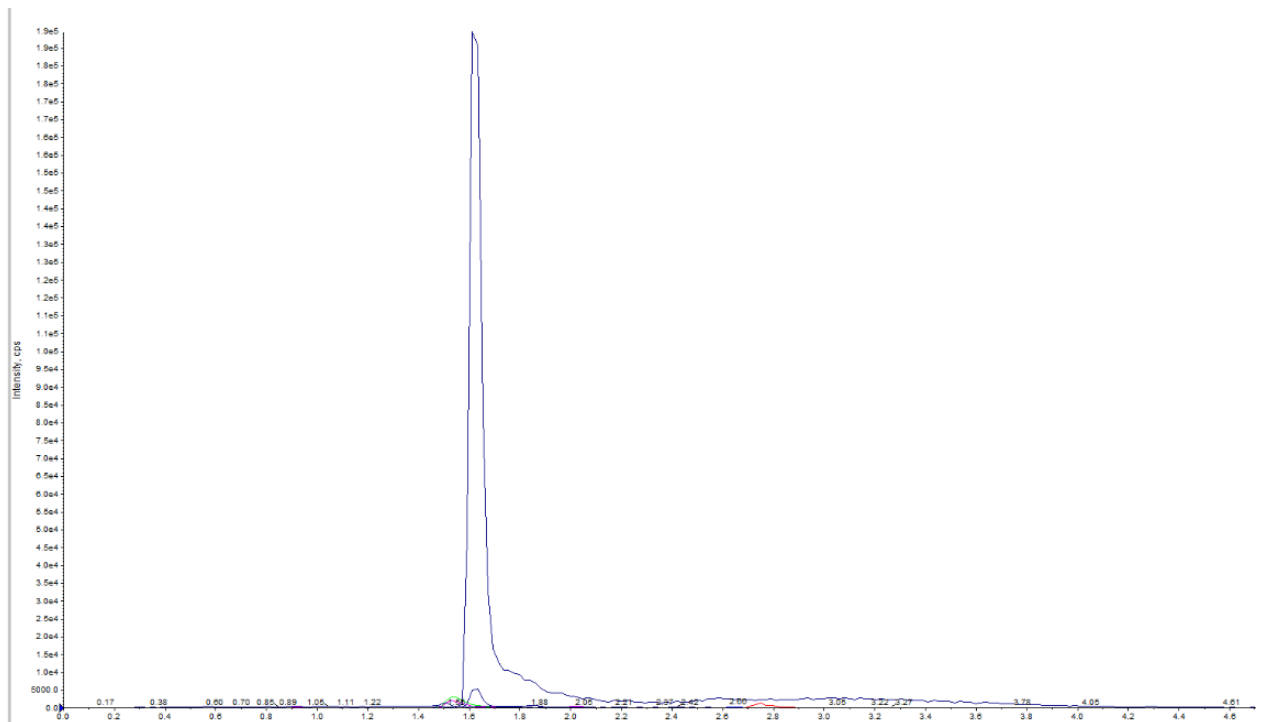


Рисунок 23. Хромато-масс-спектрограмма празозина в плазме крови: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

3.8 Валидация пиперациллина в плазме крови

В ходе валидации разработанного метода были установлены основные валидационные параметры: линейность, точность, правильность, чувствительность (нижний предел количественного определения). Разработанная методика подтвердила свою линейность в диапазоне концентраций от 0,5 до 100 мкг/мл при использовании взвешенного коэффициента $1/x^2$, при этом $r^2 > 0,99$. Коэффициент вариации (%), рассчитываемый при определении меж- и внутрисуточных точности не превышал 15% для основного диапазона концентраций.

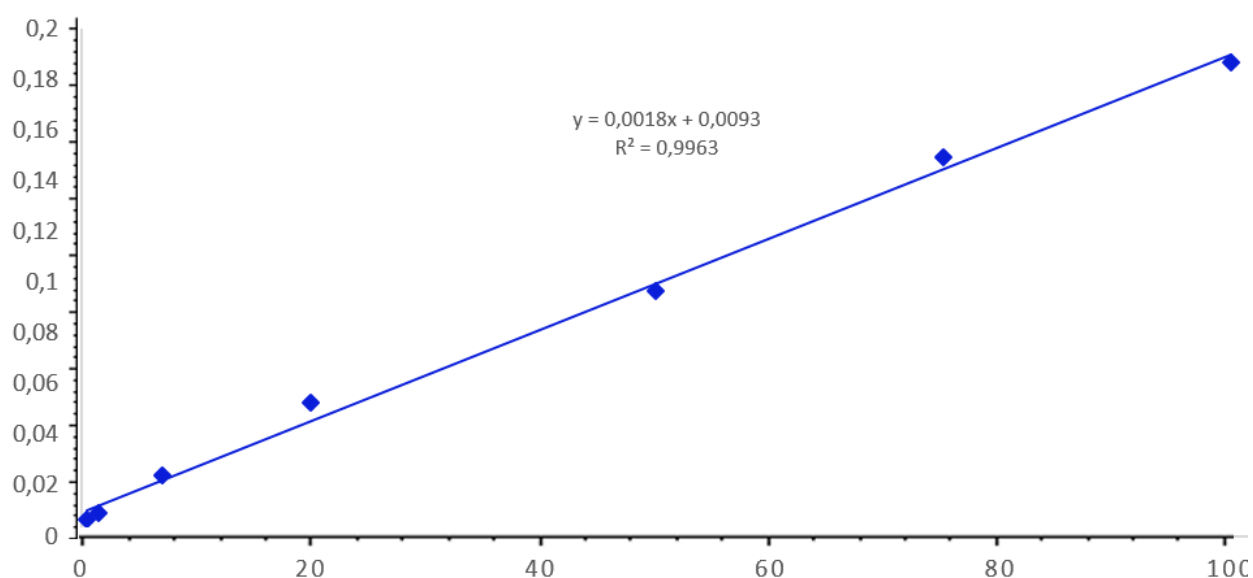


Рис. 24 Калибровочная кривая пиперациллина в плазме крови добровольцев: по оси абсцисс — C (нг/мл), по оси ординат — $\text{AreaAnalyte}/\text{AreaIS}$.

Нижний предел количественного определения методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация пиперациллина в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которого возможно количественное определение ванкомицина со значениями относительного стандартного отклонения не более 20 %. Нижний предел количественного определения методики составил 0,5 мкг/мл (Табл. 13).

Таблица 13. Таблица валидационных параметров количественного определения пиперациллина для метода с использованием в качестве пробоподготовки преципитацию белков.

Параметр		Значение			
		QCLOQ (0,5 мкг/мл)	QCL (1,5 мкг/мл)	QCM (50 мкг/мл)	QCH (75 мкг/мл)
Прецизионность (CV %)	Внутри цикла	4,1	11,2	3,70	5,5
	Между циклами	14,8	14,2	7,1	6,7
Правильность (%)	Внутри цикла	113,5	98,8	92,4	102,1
	Между циклами	92,1	95,8	97,5	105,2
Стабильность (%)		-	96,8	-	107,9
Селективность (%)		5,1	-	-	-
Коэффициент корреляции		0,99			

3.9 Валидация пиперациллина в образцах «высушенной капли крови»

Также была проведена валидация ВЭЖХ-МС метода количественного определения пиперациллина в образцах «высушенной капли крови».

Разработанная методика подтвердила свою линейность в диапазоне концентраций от 1 до 1 00 мкг/мл при использовании взвешенного коэффициента $1/x^2$, при этом $r^2 > 0,99$. Коэффициент вариации (%),

рассчитываемый при определении меж- и внутрисуточных точности не превышал 15% для основного диапазона концентраций.

Нижний предел количественного определения методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НКМО методики принималась минимальная концентрация пиперациллина в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которого возможно количественное определение ванкомицина со значениями относительного стандартного отклонения не более 20 %. Нижний предел количественного определения методики составил 0,5 мкг/мл (Табл. 14).

Таблица 14. Таблица валидационных параметров для метода с использованием в качестве пробоподготовки «высушенную каплю крови».

Параметр		Значение			
		QCLOQ (0,5 мг/мл)	QCL (1,5 мг/мл)	QCM (50 мг/мл)	QCN (75 мг/мл)
Прецизионность (CV %)	Внутри цикла	3,2	4,1	1,8	4,2
	Между циклами	6,9	3,5	7,9	7,2
Правильность (%)	Внутри цикла	102,9	98,1	105,4	104,2
	Между циклами	108,4	105,6	98,2	100,2
Стабильность (%)		-	88,3	-	91,2
Селективность (%)		5,5	-	-	-
Коэффициент корреляции		0,99			

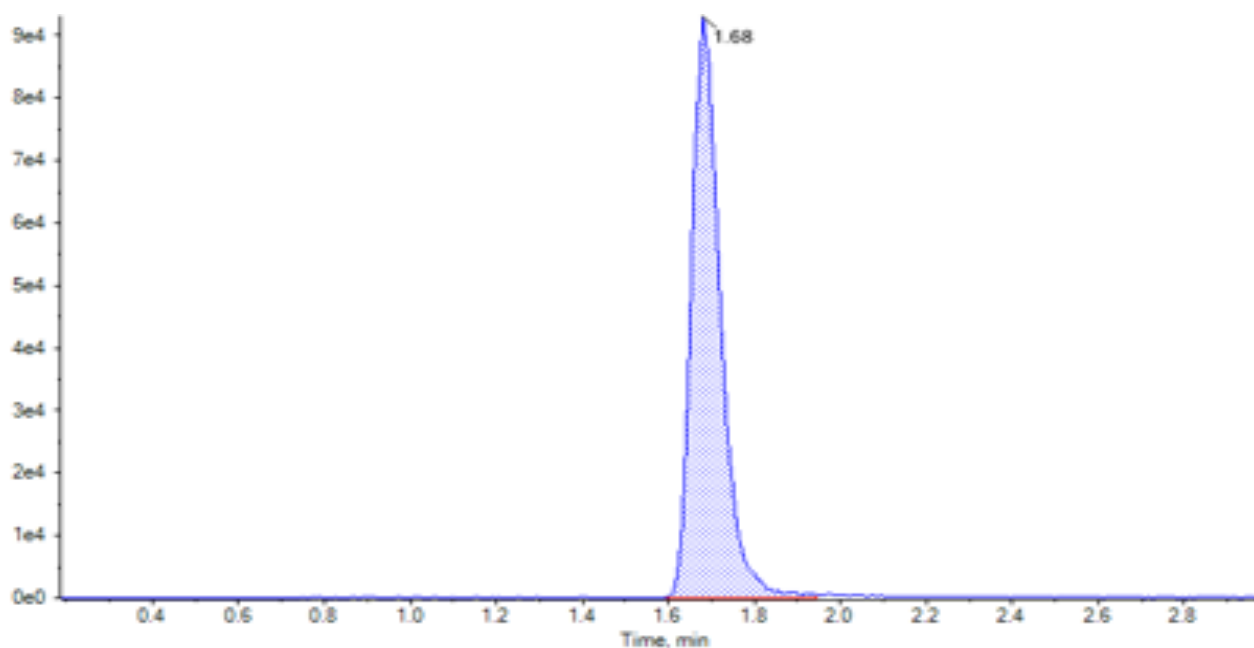


Рисунок 25. Хромато-масс-спектрограмма пиперациллина в образцах «высушенной капли крови»: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

Также для метода «высушенной капли крови» было оценено влияние специфических параметров нового метода на результаты анализа.

Влияние гематокрита оценивали на 3-х уровнях гематокрита (0,3; 0,4; 0,5), для QCL и QCН при этом полученные концентрации находились в диапазоне от 95,5 до 107,1% от номинальных (Табл. 15).

Таблица 15. Влияние гематокрита на результаты анализа.

Гематокрит %	QC	Номинальная концентрация (мкг/мл)	Точность (%)
0,3	LQC	1,5	106,7
	HQC	75	111,3
0,4	LQC	1,5	104,2
	HQC	75	101,8
0,5	LQC	1,5	97,2
	HQC	75	104,9

Для валидации эффекта объема провели анализ 3-х объемов (10, 40, 70 мкл) (30, 40 и 55 мкл) при среднем уровне гематокрита (0,4), на 2-х уровнях концентрации в 5 сериях. Относительная погрешность рассчитанных концентраций не превышала — 15% от полученных значений при среднем объеме.

При валидации однородности капли сравнили результаты образцов контроля качества при QCL и QCN, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и с края. Анализ проводился в 5 сериях. При этом относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не превышала 15% от номинальных.

Термическая стабильность была оценена при хранении образцов «высушенной капли» в течении 14 дней при температуре 22°C и 45 °C, как потенциально возможные температуры при хранении и транспортировке образцов. Для оценки стабильности использовали образцы DBS на уровнях QCL и QCN при этом образцы проанализированы в трех временных точках 1, 7 и 14 дней вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивались со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов контроля качества. При этом полученные значения по формуле X после 14 дней хранения находились в диапазоне от 89,7-95,4%.

Заключение: Разработанная методика количественного ВЭЖХ-МС/МС определения концентрации пиперациллина в образцах «высушенной капли крови» в отличии от разработанных ранее методик позволяет сократить время анализа с 4 до 2 минут. При этом все параметры валидации соответствовали критериям приемлемости. Образцы «высушенной капли крови» были стабильны в течение 14 дней при температуре 22°C и 45 °C. Небольшой объем крови, сокращенное время анализа в сочетании с простотой аналитической методики позволяют сделать этот метод полезным

для терапевтического лекарственного мониторинга пиперациллина в сложных клинических случаях. Также проведенная оценка специфических параметров валидации, характерных для образцов «высушенной капли» не показала влияние этих параметров на результат анализа, что в ранних исследованиях не было доказано и ставило под сомнение использование разработанных методик в реальной клинической практике [92].

3.10 Разработка и валидация ВЭЖХ-МС/МС метода количественного определения эверолимуса

В процессе литературного поиска было отмечено несколько различных подходов к детектированию исследуемого вещества. На основании опубликованных данных в процессе разработки методики были оценены различные способы детектирования, в том числе различные способы ионизации при масс-спектрометрическом детектировании [154].

Разработка метода количественного ВЭЖХ-МС/МС определения эверолимуса включала определения оптимальных параметров хроматографического разделения, а также последующей масс-спектрометрической детекции. В качестве метода ионизации был использован электроспрей (ESI). Детекция ионов проводилась в режиме положительной полярности [64].

Ионы-«предшественники» эверолимуса – m/z 975,6. Для построения метода мониторинга множественных реакций (MRM) использовались ионные переходы, соответствующие наибольшей интенсивности ионов-«продуктов». Было установлено, что в ходе диссоциации в камере соударений наиболее интенсивные иона-«продукта» равны m/z 908,6 (Рис. 25).

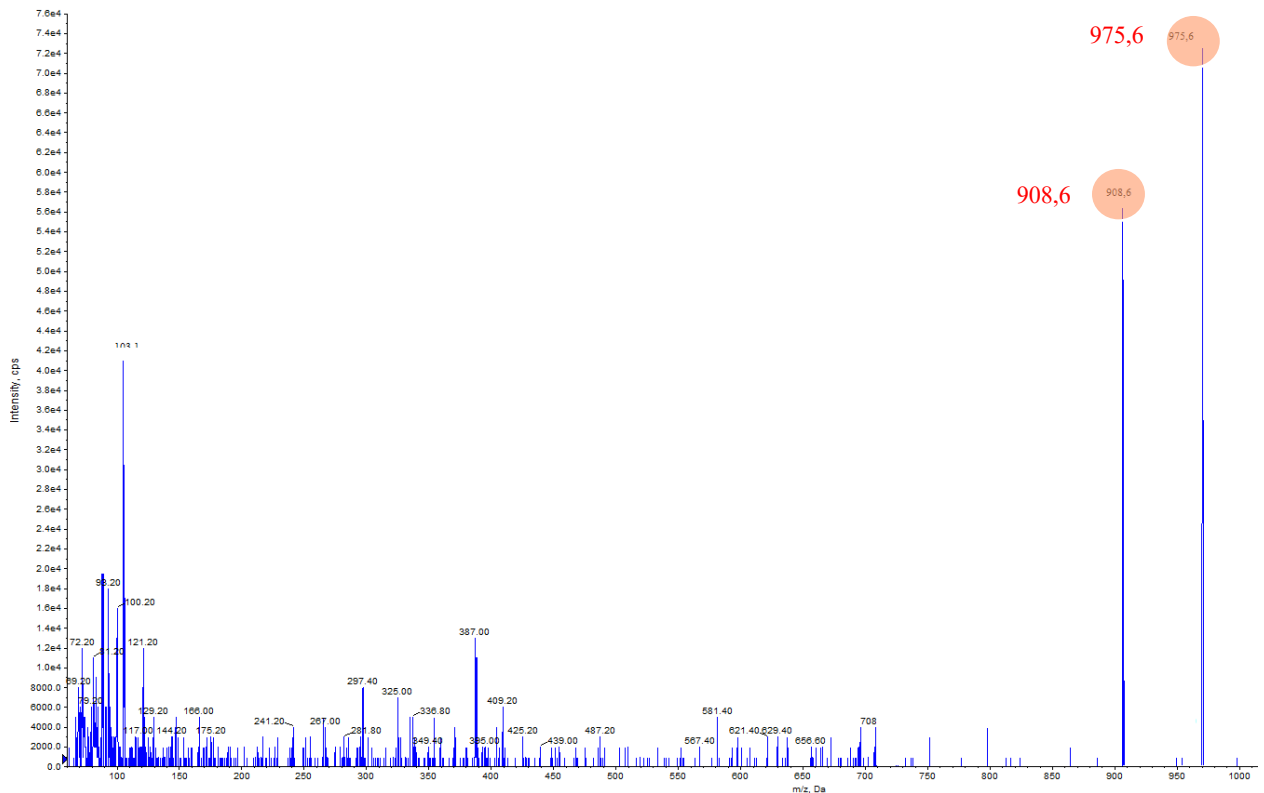


Рисунок 26. Масс-спектр эверолимуса в плазме крови: по оси абсцисс – время m/z (Da), по оси ординат – интенсивность сигнала.

Компонент А мобильной фазы представлял собой смесь 0,1% уксусной кислоты и 2 ммоль ацетата аммония в воде, компонент В состоял из 0,1% уксусной кислоты и 2 ммоль ацетата аммония в метаноле.

Был выбран градиентный режим хроматографического разделения со скоростью потока 0,5 мл/мин, при этом соотношение компонентов А (%) / В (%) изменялось следующим образом: 0–0.5 35/65→0.5–2.0 0/100→2.0–3.0 35/65.

При этих условиях время удерживания эверолимуса в образцах плазмы крови и в образцах «высушенной капли крови» 0,97-1,25 мин.

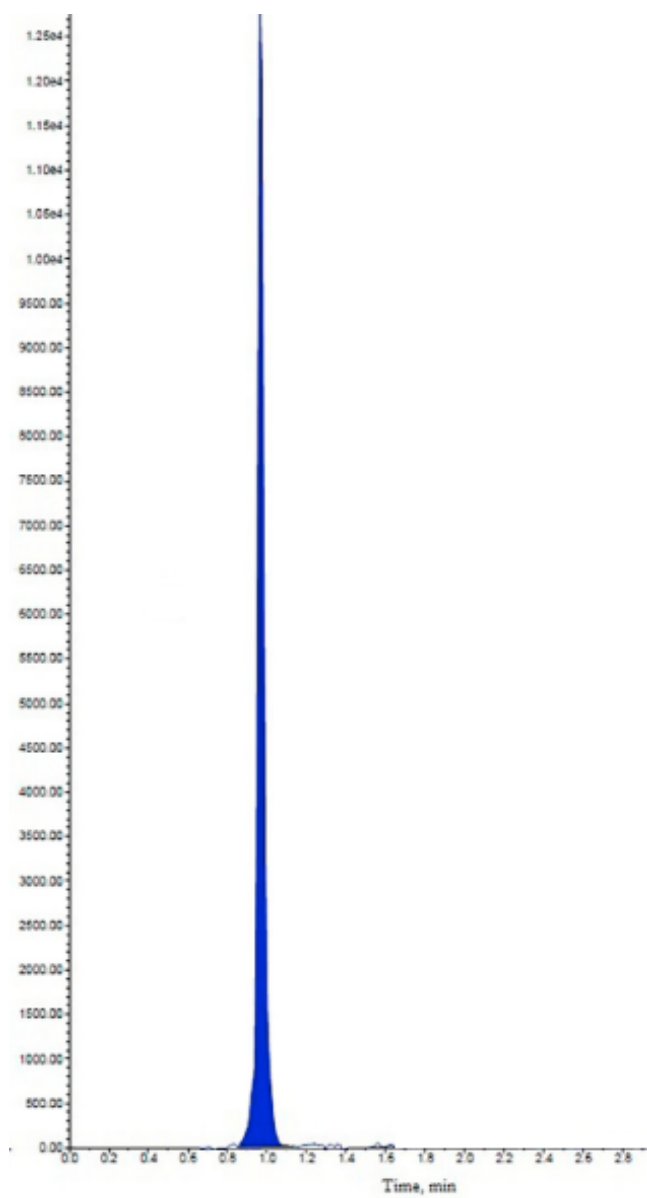


Рисунок 27. Хромато-масс-спектрограмма эверолимуса в плазме крови:
по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

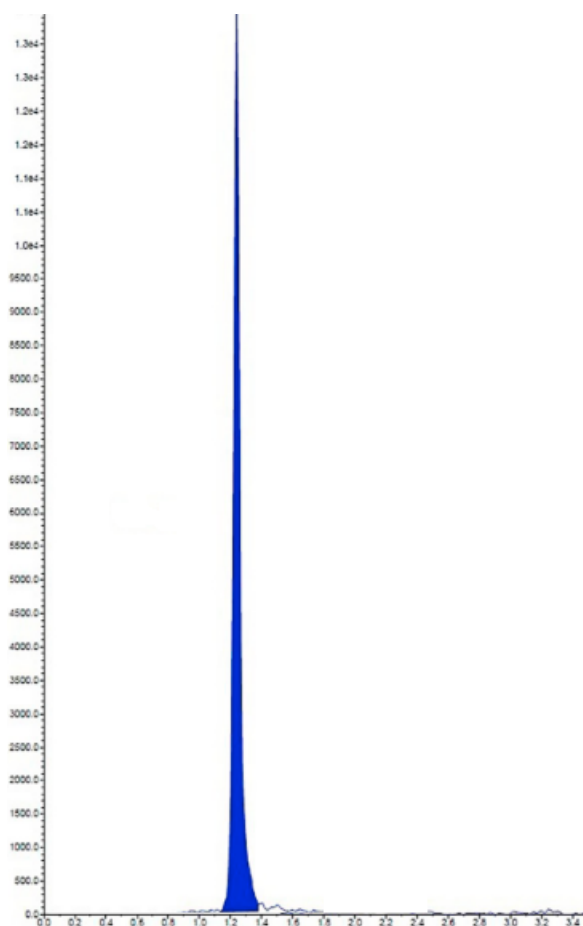


Рисунок 28. Хромато-масс-спектрограмма эверолимуса в образцах «высушенной капли крови»: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала

3.11 Валидация эверолимуса в плазме крови

В ходе валидации разработанного метода были установлены основные валидационные параметры: линейность, точность, правильность, чувствительность (нижний предел количественного определения). Разработанная методика подтвердила свою линейность в диапазоне концентраций от 1 до 50 нг / мл при использовании взвешенного коэффициента $1/x^2$, при этом $r^2 > 0,98$. Коэффициент вариации (%), рассчитываемый при определении меж- и внутрисуточных точности не превышал 15% для основного диапазона концентраций.

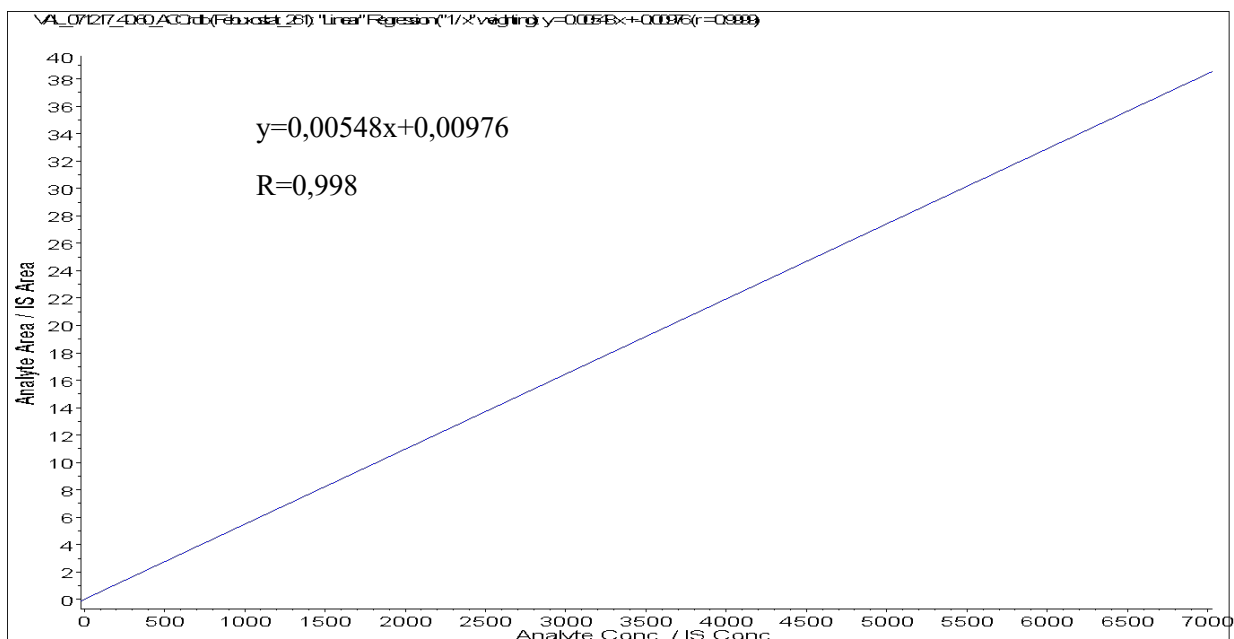


Рисунок 29. Калибровочная кривая эверолимуса в плазме крови добровольцев: по оси абсцисс – С (нг/мл), по оси ординат - AreaAnalyte/AreaIS.

Нижний предел количественного определения методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация пиперациллина в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которого возможно количественное определение ванкомицина со значениями относительного стандартного отклонения не более 20 %. Нижний предел количественного определения методики составил 1 нг/мл (Табл. 16).

Таблица 16. Таблица валидационных параметров количественного определения эверолимуса для метода с использованием в качестве пробоподготовки преципитацию белков.

Параметр		Значение			
		QCLOQ (1 нг/мл)	QCL (3 нг/мл)	QCM (25 нг/мл)	QCN (40 нг/мл)
Прецизионность (CV %)	Внутри цикла	9,2	8,4	4,7	5,1
	Между циклами	12,5	10,8	5,6	4,0
Правильность (%)	Внутри цикла	113,0	109,2	98,5	97,1
	Между циклами	101,9	105,4	97,1	102,3
Стабильность (%)		-	96,8	-	107,9
Селективность (%)		8,7	-	-	-
Коэффициент корреляции		0,98			

3.12 Валидация эверолимуса в образцах «высушенной капли крови»

Также была проведена валидация ВЭЖХ-МС метода количественного определения эверолимуса в образцах «высушенной капли крови».

Разработанная методика подтвердила свою линейность в диапазоне концентраций от 1 до 1 00 нг/мл при использовании взвешенного коэффициента $1/x^2$, при этом $r^2 > 0,98$. Коэффициент вариации (%), рассчитываемый при определении меж- и внутрисуточных точности не превышал 15% для основного диапазона концентраций.

Нижний предел количественного определения методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация эверолимуса в образцах «высушенной капли крови» в аналитическом диапазоне, для которого возможно количественное определение эверолимуса со значениями относительного стандартного отклонения не более 20 %. Нижний предел количественного определения методики составил 1 нг/мл (Табл. 17).

Таблица 17. Таблица валидационных параметров для метода с использованием в качестве пробоподготовки «высушенную каплю крови».

Параметр		Значение			
		QCLOQ (1 нг/мл)	QCL (3 нг/мл)	QCM (25 нг/мл)	QCN (40 нг/мл)
Прецизионность (CV %)	Внутри цикла	5,4	8,2	10,5	8,0
	Между циклами	2,7	4,7	8,9	13,5
Правильность (%)	Внутри цикла	91,3	98,8	103,7	107,5
	Между циклами	88,7	94,6	93,2	98,6
Стабильность (%)	-	88,3	-	91,2	
Селективность (%)	4,1	-	-	-	
Коэффициент корреляции	0,98				

Также для метода «высушенной капли крови» было оценено влияние специфических параметров нового метода на результаты анализа.

Влияние гематокрита оценивали на 3-х уровнях гематокрита (0,3; 0,4; 0,5), для QCL и QCN при этом полученные концентрации находились в диапазоне от 95,5 до 107,1% от номинальных (Табл. 18).

Таблица 18. Влияние гематокрита на результаты анализа.

Гематокрит %	QC	Номинальная концентрация (нг/мл)	Точность (%)
0,3	LQC	3	92,5
	HQC	40	88,3
0,4	LQC	3	94,8
	HQC	40	105,5
0,5	LQC	3	104,6
	HQC	40	108,1

Для валидации эффекта объёма провели анализ 3-х объёмов (10, 40, 70 мкл) (30, 40 и 55 мкл) при среднем уровне гематокрита (0,4), на 2-х уровнях концентрации в 5 сериях. Относительная погрешность рассчитанных концентраций не превышала — 15% от полученных значений при среднем объёме.

При валидации однородности капли сравнили результаты образцов контроля качества при QCL и QCN, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и с края. Анализ проводился в 5 сериях. При этом относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не превышала 15% от номинальных.

Термическая стабильность была оценена при хранении образцов «высушенной капли» в течении 14 дней при температуре 22°C и 45 °C, как

потенциально возможные температуры при хранении и транспортировке образцов. Для оценки стабильности использовали образцы DBS на уровнях QCL и QCN при этом образцы проанализированы в трех временных точках 1, 7 и 14 дней вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивались со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов контроля качества. При этом полученные значения по формуле X после 14 дней хранения находились в диапазоне от 89,4-96,1%.[54, 89]

Заключение: Была разработана и валидирована методика количественного ВЭЖХ-МС/МС определения концентрации эверолимуса в образцах «высушенной капли крови». При этом все параметры валидации соответствовали критериям приемлемости. Образцы «высушенной капли крови» были стабильны в течение 14 дней при температуре 22°C и 45 °C. Небольшой объем крови, сокращенное время анализа в сочетании с простотой аналитической методики позволяют сделать этот метод полезным для терапевтического лекарственного мониторинга пиперациллина в сложных клинических случаях. Также проведенная оценка специфических параметров валидации, характерных для образцов «высушенной капли» не показала влияние этих параметров на результат анализа, что в ранних исследованиях не было доказано и ставило под сомнение использование разработанных методик в реальной клинической практике.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для успешного проведения ТЛМ необходимо применение специфических валидированных методик, знание новых физико-химических подходов к пробоподготовке биообразцов и наличие современного оборудования. Использование сыворотки крови либо плазмы в качестве биологического материала для проведения ТЛМ исследуемого лекарственного препарата не всегда является возможным или неприменим в принципе. Однако метод «высушенной капли крови» - простой и минимально инвазивный отбор проб, который обладает рядом преимуществ перед стандартными способами пробоотбра такими как:

- Возможность получить более информативную кривую «концентрация-время»
- Требуется небольшой объем.
- Удобное хранение и транспортировка [199,104].
- Наборы для отбора проб для стандартных образцов крови требуют больше лабораторного оборудования, особенно пробирок, чем для пробоотбора DBS [171].

Возможные ограничения метода, связанные с возможностью применения высокоспецифичных и селективных метод анализа, а также разработкой соответствующих протоколов взятия, хранения и анализа, которые ранее были применены только стандартных образцов с использованием традиционных методов сбора материала.

С помощью разработанных нами новых протоколов были собраны образцы высушенной капли с соответствующими рекомендациями для лучшего последующего определения лекарственных препаратов. При этом был было произведено сравнение по соответствующим стандартным и специфическим параметрам, таким как объем капли, место выреза и стабильность при условиях сушки.

Были разработаны и валидированы методы количественного ВЭЖХ-МС/МС определения: эверолимуса, ванкомицина, пиперациллина, ивабрадина в плазме крови с использованием стандартных методов пробоподготовки (преципитации белков и др.) и в образцах высушенной крови для метода «высушенной капли».

При разработке условий масс-спектрометрической детекции искомым веществ методом мониторинга множественных реакций (MRM) были определены ионы-«предшественники» и соответствующие им ионы-«продукты». Ионы-«предшественники» ванкомицина соответствовали частицам m/z 725,3. Наиболее интенсивными ионами-«продуктами», зарегистрированными при фрагментации протонированных молекул в ячейке соударений, были частицы m/z 88,1 и m/z 387,9 для ванкомицина. Ионы-«предшественники» пиперациллина был ион m/z 518,2 соответственно. Наиболее интенсивными ионами-«продуктами», зарегистрированными при фрагментации протонированных молекул в ячейке соударений, были частицы m/z 143,1, m/z 115,0 для пиперациллина.

Ионы-«предшественники» ивабрадина соответствовали частицам с m/z 469, ионы-«предшественники» N-десметиливабрадина – m/z 455. Для построения метода мониторинга множественных реакций (MRM) использовались ионные переходы, соответствующие наибольшей интенсивности ионов-«продуктов». Было установлено, что оба вещества в ходе диссоциации в камере соударений дают по два наиболее интенсивны иона-«продукта»: m/z 262,2 и 177,1 для ивабрадина.

Ионы-«предшественники» эверолимуса – m/z 975,6. Наиболее интенсивные иона-«продукта» равны m/z 908,6

Разработанные методики подтвердили свою линейность в выбранных диапазонах концентраций при использовании взвешенного коэффициента $1/x^2$, при этом $r^2 > 0,99$. Коэффициент вариации (%), рассчитываемый при определении меж- и внутрисуточных точности не

превышал 15% для основного диапазона концентраций для всех лекарственных препаратов.

Нижний предел количественного определения методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности.

Влияние гематокрита оценивали на 3-х уровнях гематокрита (0,3; 0,4; 0,5), для QCL и QCN при относительная погрешность рассчитанных концентраций не превышала — 15% от полученных значений при среднем объёме капли.

Для валидации эффекта объёма провели анализ 3-х объёмов (10, 40, 70 мкл) (30, 40 и 55 мкл) при среднем уровне гематокрита (0,4), на 2-х уровнях концентрации в 5 сериях. Относительная погрешность рассчитанных концентраций не превышала — 15% от полученных значений при среднем объёме.

При валидации однородности капли сравнили результаты образцов контроля качества при QCL и QCN, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и с края. Анализ проводился в 5 сериях. При этом относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не превышала 15% от номинальных.

Термическая стабильность была оценена при хранении образцов «высушенной капли» в течении 14 дней при температуре 22°C и 45 °C, как потенциально возможные температуры при хранении и транспортировке образцов. Для оценки стабильность использовали образцы DBS на уровнях QCL и QCN при этом образцы проанализированы в трех временных точках 1, 7 и 14 дней вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивались со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов контроля качества. При этом полученные значения по формуле X после 14 дней хранения находились в диапазоне от 89,4-96,1%.

Разработанные методика количественного ВЭЖХ-МС/МС определения концентрации выбранных препаратов в образцах «высушенной капли крови» в отличии от разработанных ранее методик позволили сократить время анализа. При этом все параметры валидации соответствовали критериям приемлемости. Образцы «высушенной капли крови» были стабильны в течение 14 дней при температуре 22°C и 45 °C. Небольшой объем крови, сокращенное время анализа в сочетании с простотой аналитической методики позволяют сделать этот метод полезным для терапевтического лекарственного мониторинга препаратов с узким терапевтическим диапазоном в сложных клинических случаях. Также проведенная оценка специфических параметров валидации, характерных для образцов «высушенной капли» не показала влияние этих параметров на результат анализа, что в ранних исследованиях не было доказано и ставило под сомнение использование разработанных методик в реальной клинической практике [81].

Также с помощью метода «высушенной капли крови» была оптимизирована разработанная ранее методика количественного определения ивабрадина и его N-деметилированного метаболита в биологических пробах с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

При сравнении двух разработанных методов, было выявлено, что использование в качестве пробоподготовки метод «высушенной капли крови» в отличии от твердофазной экстракции позволяет снизить время анализа с 8,2 до 1,7 минут. Также увеличилась чувствительность анализа: нижний предел количественного определения с использованием твердофазной экстракции составил 10 нг/мл, тогда как с использованием «высушенной капли крови» и ВЭЖХ-МС/МС 1 нг/мл. При этом количество биообразца для нового метода составляет всего несколько капель цельной крови, при этом для ранее разработанной методики необходимо

значительно большее количество плазмы крови. Данные преимущества метода «высушенной капли крови» в качестве пробоподготовки с использованием ВЭЖХ-МС/МС значительно упрощают проведение фенотипирования СYP3A4 с использованием «ивабрадинового теста» для проведения мониторинга изменения активности данного изофермента у пациентов, получающих его индуктор, либо ингибитор в составе плановой фармакотерапии.

Выводы

1) Метод «высушенной капли» — это простой, минимально инвазивный процесс отбора проб с более удобным способом хранения и транспортировки биоматериала. Данный метод призван облегчить терапевтический лекарственный мониторинг многих препаратов и позволяет легко проводить отбор проб.

2) Разработанный метод количественного определения ванкомицина с помощью «высушенной капли крови» позволяет проводить терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) у новорожденных в терапевтическом диапазоне. Разработаны оптимальные протоколы взятия и хранения биологических образцов. Валидационные параметры разработанных методов количественного определения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием в преаналитическом этапе метода «высушенной капли крови» соответствуют требованиям нормативной документации. Линейный аналитический диапазон укладываются в терапевтический. Новая методика в отличии от разработанных ранее позволяет сократить время анализа в 4 раза.

3) Оптимизирован метод фенотипирования с помощью ивабрадинового теста с использованием метода «высушенной капли крови», что позволило снизить время анализа более чем в 4 раза и повысить чувствительность в 10 раз. Разработаны оптимальные протоколы взятия и хранения биологических образцов. Валидационные параметры разработанных методов количественного определения ВЭЖХ-МС/МС с использованием в преаналитическом этапе метода «высушенной капли крови» соответствуют требованиям нормативной документации.

4) Разработан и валидирован метод количественного ВЭЖХ-МС/МС определения пиперациллина с использованием метода «высушенной капли крови», который позволяет проводить ТЛМ у пациентов принимающие

пиперациллин при длительной инфузии, что позволит снизить смертность пациентов с сепсисом и улучшит воздействие противомикробных препаратов. Определённый аналитический диапазон соответствуют терапевтическому. Данный метод позволяет сократить время анализа в 2 раза.

5) Разработан и валидирован метод количественного ВЭЖХ-МС/МС определения эверолимуса с использованием метода «высушенной капли крови», который позволит проводить ТЛМ эверолимуса, что оптимизирует иммуносупрессивную терапию необходимую на протяжении всей жизни пациентов так как позволяет поддерживать концентрацию препаратов в рамках терапевтического диапазона и избежать нежелательных реакций.

б) При валидации методик были впервые определены специфические параметры для метода «высушенной капли крови»: гематокрит, место выреза, объем капли для ивабрадина, ванкомицина, пиперациллина и эверолимуса. что позволяет рекомендовать данные методики для рутинной клинической практики при проведении фенотипирования с помощью ивабрадина, а также проведения ТЛМ препаратов с узким терапевтическим диапазоном: ванкомицин, пиперациллин, эверолимус. Образцы «высушенной капли крови» стабильны в течение 14 дней при температуре 22°C и 45 °C. Проведенная оценка специфических параметров валидации не показала влияние на результат анализа и соответствуют критериям приемлемости. Влияние гематокрита оценивали на 3-х уровнях гематокрита (0,3; 0,4; 0,5), для QCL (Low level - нижний концентрационный уровень) и QCH (High level - верхний концентрационный уровень) при относительная погрешность рассчитанных концентраций не превышала — 15% от полученных значений при среднем объёме капли. Для валидации эффекта объёма провели анализ 3-х объёмов (10, 40, 70 мкл) (30, 40 и 55 мкл) при среднем уровне гематокрита (0,4), на 2-х уровнях концентрации в 5 сериях. Относительная погрешность рассчитанных концентраций не превышала — 15% от полученных значений при среднем объёме. При валидации однородности капли сравнили

результаты образцов контроля качества при QCL и QCN, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и с края. Анализ проводился в 5 сериях. При этом относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не превышала 15% от номинальных.

Практические рекомендации

1. Рекомендовать метод «высушенной капли крови» для проведения фенотипирования в ивабрадиновом тесте пациентов при проведении ТЛМ, клинических испытаний инновационных лекарственных средств и оценки биоэквивалентности дженериков. Выявлено, что использование в качестве пробоподготовки метода «высушенной капли крови» в отличии от твердофазной экстракции позволяет снизить время анализа более чем в 4 раз

2. Рекомендовать метод «высушенной капли крови» для проведения ТЛМ, так как требует малых объемов проб крови, позволяет сократить время анализа, повысить пороги определения лекарственных средств и проводить мониторинг в любых возрастных категориях, как у новорожденных, так и у пожилых людей. Валидированные параметры методики количественного ВЭЖХ-МС/МС определения концентрации лекарственных средств ванкомицин, пиперациллин и эверолимус могут быть использованы в клинической практике. Образцы «высушенной капли крови» стабильны в течение 14 дней при температуре 22°C и 45 °C. Проведенная оценка специфических параметров валидации не показала влияние на результат анализа и соответствуют критериям приемлемости.

Список использованных сокращений

ВПКО – верхний предел количественного определения

ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС/МС - с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

ГХ-МС/МС — газовая хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

ГХ - газовая хроматография

ЕАЭС - Евразийский экономический союз

ЛВ — лекарственное вещество

ЛП — лекарственный препарат

ЛС — лекарственное средство

МС - масс-спектрометрия

НПР - Неблагоприятная (нежелательная) побочная реакция

НПКО — нижний предел количественного определения

ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг

ФК – Фармакокинетика

ФД – Фармакодинамика

АСN – ацетонитрид

DBS – Dried Blood Spot (высушенная капля крови)

EBF - European Bioanalysis Forum

EMA — European Medicines Agency (Европейское медицинское агенство)

ESI – электрораспылительная ионизация

FDA - Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов)

MRM - Multiple reaction monitoring (Мониторинг множественных реакций)

LC-MS - Liquid chromatography–mass spectrometry

LLOQ – lower limit of quantification (нижний предел количественного определения)

QCL - Low level (нижний концентрационный уровень)

QCM - Medium level (верхний концентрационный уровень)

QCH - high level (верхний концентрационный уровень)

Список литературы

1. Адаптация метода "высушенной капли крови" для проведения терапевтического лекарственного мониторинга / В.И. Петров, И.С. Аникеев, Т.Е. Заячникова [и др.] // Фармация и фармакология. 2022. Т. 10. № 4. С. 331–342
2. Аникеев, И. С. Сравнительная оценка валидационных параметров хромато–масс–спектрометрического определения ванкомицина с использованием технологии «высушенной капли» / И. С. Аникеев // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины : Материалы 78–й международной научно–практической конференции молодых ученых и студентов, Волгоград, 14–16 октября 2020 года. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2020. – С. 43. – EDN HEJCNУ.
3. Аникеев, И. С. Разработка протокола валидации методов количественного определения лекарственных препаратов с использованием технологии «высушенной капли» / И. С. Аникеев // XXV Региональная конференция молодых учёных и исследователей Волгоградской области: Материалы конференции, Волгоград, 24 ноября 2020 года / Под редакцией М.Е. Стаценко. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2021. – С. 146–148. – EDN MDZCCL.
4. Батулин, В.А. Изменение познавательных способностей у детей, больных эпилепсией, при лечении бензоналом в зависимости от индивидуальных особенностей его фармакокинетики / В.А. Батулин, С.Н. Руденко // Медицинский вестник Северного Кавказа. — 2015. — №4. — С. 398–402.
5. Батулин, В.А. Рутинная практика терапевтического лекарственного мониторинга — некоторые итоги работы в системе ОМС / В. А. Батулин, М. В. Батурина, А. А. Котова, А. А. Скрипнюк // Качественная

клиническая практика. – 2016. – С. 47–49.

6. Батури́н, В.А. Совершенствование стандартов лечения эпилепсии / В.А. Батури́н, С.Н. Руденко, С.В. Барабаш // Проблемы стандартизации в здравоохранении. — 2010. — № 9–10. — С. 3–5.

7. Биофармацевтические свойства и сравнительная кинетика растворения генерических лекарственных средств глибенкламида / И.Е. Шохин, Г.В. Раменская, Г.Ф. Василенко [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2009. – №6. –С. 36–8.

8. Бондарева, И. Б. Популяционный фармакокинетический анализ данных терапевтического лекарственного мониторинга леветирацетама у недоношенных новорожденных с неонатальными судорогами / И. Б.

9. Бондарева, И. Б. Фармакокинетический анализ данных терапевтического лекарственного мониторинга меропенема в крови у взрослых пациентов, находящихся в критическом состоянии / И. Б. Бондарева, С. К. Зырянов, М. С. Ченкуров // Антибиотики и химиотерапия. – 2021. – Т. 66, № 11–12. – С. 31–38. – DOI 10.37489/0235–2990–2021–66–11–12–31–38. – EDN IERLEU.

10. Бондарева, С. К. Зырянов, М. А. Ивжиц // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2021. – Т. 100, № 1. – С. 190–200. – DOI 10.24110/0031–403X–2021–100–1–190–201. – EDN SEXYDC.

11. Васиярова, Н. М. Терапевтический лекарственный мониторинг вальпроевой кислоты и карбамезепина в крови пациентов с эпилепсией / Н. М. Васиярова, М. Ю. Прокудин, А. В. Бобков // Известия Российской военно–медицинской академии. – 2022. – Т. 41, № S2. – С. 87–90. – EDN WIWZCG.

12. Влияние верапамила SR на концентрацию аторвастатина в плазме крови больных ишемической болезнью сердца / О. В. Магницкая, Л. А. Смирнова, А. Ф. Рябуха [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2012. – № 4(44). – С. 43–45. – EDN PKPRYN.

13. Изменения кишечной микробиоты и биотрансформации

ивабрадина у крыс при экспериментальной алкоголизации / Б. Е. Толкачев, Е. И. Морковин, Л. П. Кнышова [и др.] // Самарский научный вестник. – 2017. – Т. 6, № 3(20). – С. 47–51. – EDN ZFDEBL.

14. Казаков, Р. Е. Пути оптимизации применения статинов: генетические факторы и терапевтический лекарственный мониторинг / Р. Е. Казаков, А. Б. Прокофьев // Фармакогенетика и фармакогеномика. – 2020. – № 1. – С. 11–18. – DOI 10.37489/2588–0527–2020–1–11–18. – EDN OYLEVY.

15. Количественное определение ивабрадина у больных ишемической болезнью сердца / К. А. Кузнецов, А. Ф. Рябуха, О. В. Магницкая [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – № 2(38). – С. 48–50. – EDN NVAARN.

16. Крюков, Е.В. Ультранизкодозированная менопаузальная гормонотерапия с дидрогестероном: роль в профилактике развития и прогрессирования атеросклероза / Е.В. Крюков [и др.] // Вестник Российской Военно–медицинской академии. – 2021. –Т. 23. –№1. – С. 9–14. doi: 10.17816/brmma63562

17. Леонов, К. А. Разработка и валидация биоаналитической методики количественного определения иматиниба в плазме крови человека методом ВЭЖХ / К. А. Леонов, А. А. Бакибаев // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2017. – Т. 17, № 1. – С. 122–130. – EDN YLPCBL.

18. Межиндивидуальные особенности фармакокинетики противоопухолевых препаратов у здоровых добровольцев / Р. А. Осешнюк, И. Э. Ушал, Е. В. Светкина [и др.] // Обзоры по клинич. фармакол. и лек. терапии. – 2017. – №1.

19. Мирошниченко, И. И. Определение сывороточных/плазменных концентраций психотропных препаратов в терапевтическом лекарственном мониторинге / И. И. Мирошниченко, Н. В. Баймеева, А. И. Платова // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2021. – № 1. – С. 3–13. – DOI 10.37489/2587–7836–2021–1–3–13. – EDN MZEUAQ.

20. Муратов, К.М. Сравнение показателей фармакокинетики ванкомицина, полученных на основании терапевтического лекарственного мониторинга и методом математического моделирования / К.М. Муратов, Т.Е. Морозова // *Фармакогенетика и фармакогеномика*. – 2018. – № 2. – С. 27–27.

21. Определение метаболического отношения N–деметиливабрадин/ивабрадин для оценки активности CYP3A4 / В. И. Петров, О. В. Магницкая, Б. Е. Толкачев [и др.] // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. – 2013. – № 3(47). – С. 30–32. – EDN RCJGPP.

22. Определение эффективности антибактериальной терапии путём проведения терапевтического лекарственного мониторинга / А. М. Казанова, М. С. Ченкуров, А. А. Копайло [и др.] // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2020. – Т. 65, № 3–4. – С. 29–33. – DOI 10.37489/0235–2990–2020–65–3–4–29–33. – EDN VJNCHV.

23. Оптимизация терапевтического лекарственного мониторинга ванкомицина у новорожденных с применением метода «высушенной капли крови» / В. И. Петров, И. С. Аникеев, Т. Е. Заячникова [и др.] // *Фармация и фармакология*. – 2023. – Т. 11, № 4. – С. 280–290. – DOI 10.19163/2307–9266–2023–11–4–280–290. – EDN WVDPXL

24. Персонализированная медицина: эволюция методологии и проблемы практического внедрения / В. И. Петров, И. Н. Шишиморов, О. В. Магницкая, Б. Е. Толкачев // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. – 2016. – № 1(57). – С. 3–11. – EDN VQZNKJ.

25. Применение тандемной масс–спектрометрии (ВЭЖХ–МСМС) в клинической диагностике URL: <https://biopharmexpert.ru/mass-spectrometry-applying/> (дата обращения: 20.00.2024)

26. Преимущества метода «высушенной капли крови» для иммуносупрессивной терапии / В. И. Петров, И. С. Аникеев, Т. Е. Заячникова [и др.] // *Волгоградский научно–медицинский журнал*. – 2023. – Т. 20, № 3. – С. 54–57. – EDN TDSYTO.

27. Разработка высокочувствительного хромато–масс–спектрометрического метода определения ванкомицина и пиперациллина в плазме крови / И. С. Аникеев, Н. А. Осадченко, П. С. Басаргина [и др.] // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины : материалы 76–й международной научно–практической конференции молодых ученых и студентов, Волгоград, 25–28 апреля 2018 года. – Волгоград: Волгоградский государственный

28. Разработка и валидация количественного вэжх–мс/мс метода определения ванкомицина в плазме крови. / В.И. Петров, И.С. Аникеев, Т.Е. Заячникова [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2022. – Т. 19. – № 4. – С. 128–134.

29. Рациональная терапия антиэпилептическими препаратами / М.М. Одинак, В. Г. Помников, М. Ю. Прокудин [и др.] // Медицинский совет – 2010. – №3–4. – С. 54– 60.

30. Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств [Текст] : практическое руководство / И. И. Мирошниченко. – Москва : Мед. информ. агентство, 2011. – 410, [1] с. : ил., табл.; 21 см.; ISBN 978–5–9986–0042–5

31. Рейхарт, Д. В. Исследование биоэквивалентности лекарственных препаратов в России / Д. В. Рейхарт // Фармация. – 2010. – №3. – С. 5–8.

32. Рекомендации по применению терапевтического лекарственного мониторинга антипсихотиков для индивидуализации подбора терапии при обострении шизофрении / С.С. Потанин, М.А. Морозова, А.Г. Бениашвили [и др.] // Обозрение психиатрии и медицинской психологии имени В.М.Бехтерева. – 2023. – № 4. – С. 111–119

33. Терапевтический лекарственный мониторинг адалимумаба при воспалительных заболеваниях кишечника у детей / А. С. Илларионов, Т. В. Радыгина, А. С. Потапов [и др.] // Вопросы детской диетологии. – 2021. – Т. 19, № 3. – С. 14–25. – DOI 10.20953/1727–5784–2021–3–14–25. – EDN NWKXFK.

34. Терапевтический лекарственный мониторинг антибиотиков: практическое значение в терапии сепсиса / Г.П. Плотников, А.Н. Кудрявцев, А.А. Клеузович [и др.] // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2022. – №19(6). – С. 62–71.

35. Терапевтический лекарственный мониторинг и биокинетика метотрексата при применении его в высоких дозах для лечения остеосаркомы у детей / А.М. Стрижевская, Е.Г. Головня, А.В.Лебедева [и др.] // Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2015. – №3.

36. Терапевтический лекарственный мониторинг метотрексата и его метаболитов в эритроцитах и мононуклеарах больных ревматоидным артритом / Г. И. Гриднева, Ю. В. Муравьев, Н. В. Баймеева [и др.] // Современная ревматология. – 2020. – Т. 14, № 4. – С. 60–64. – DOI 10.14412/1996–7012–2020–4–60–64. – EDN VWUWZU.

37. Терапевтический лекарственный мониторинг с использованием метода "высушенной капли": проблемы и перспективы / Толкачев Б.Е., Стрыгин А.В., Аникеев И.С. // Лекарственный вестник. –2021. – Т. 15. – № 3 (83). – С. 13–20.

38. Терапевтический лекарственный мониторинг, гено- и фенотипирование CYP2C9 при применении препаратов глибенкламида у больных сахарным диабетом / Г. И. Городецкая, В. В. Архипов, Е. С. Мельников, // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2020. – Т. 10, № 2. – С. 89–95. – DOI 10.30895/1991–2919–2020–10–2–89–95. – EDN DXTNZX.

39. Толкачев, Б. Е. Терапевтический лекарственный мониторинг ванкомицина у новорожденных: проблемы и перспективы / Б.Е. Толкачев, В.И. Петров, Т.Е. Заячникова [и др.] // Лечебное дело. – 2021. – № 2. – С. 17–24.

40. Толкачев, Б. Е. Терапевтический лекарственный мониторинг с использованием метода "высушенной капли": проблемы и перспективы / Б.

Е. Толкачев, А. В. Стрыгин, И. С. Аникеев // *Лекарственный вестник*. – 2021. – Т. 15, № 3(83). – С. 13–20. – EDN NWYJUR.

41. Толкачев, Б. Е. Ивабрадин как субстрат–маркер активности изофермента CYP3A4 : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Толкачев Борис Евгеньевич, 2013. – 104 с. – EDN VIMGNI

42. Толкачев, Б. Е. Разработка стратегии оптимизации фармакотерапии на основании "ивабрадинового теста" / Б. Е. Толкачев, О. В. Магницкая, Л. А. Смирнова // *Волгоградский научно–медицинский журнал*. – 2016. – № 1(49). – С. 37–39. – EDN WYHQDR.

43. Туфанова, О.С. Оценка эффективности и безопасности фармакотерапии ванкомицином у пациентов с ортопедической инфекцией с помощью методики терапевтического лекарственного мониторинга / О.С. Туфанова, А.Р. Касимова, С.А. Божкова // *Безопасность и риск фармакотерапии*. – 2022. – 10(2). – С. 128–138.

44. Эпилептический статус: реальность 2019 / С.Н. Базилевич [и др.] // *Известия Рос. Воен.–мед. акад.* – 2019. – Т.38, №3. – С. 26–32.

45. Яичков, И. И. Разработка методик количественного определения в плазме и проведение фармакокинетических исследований лекарственных препаратов микофеноловой кислоты, метилдопы и мебеверина, содержащих потенциально нестабильные функциональные группы : диссертация ... кандидата фармацевтических наук : 14.03.06 / Яичков Илья Игоревич; [Место защиты: Волгогр. гос. мед. ун–т]. – Ярославль, 2018. – 181 с. : ил.

46. A robust LC–MS/MS method for amikacin: application to cellular uptake and pharmacokinetic studies / K. Chan, W. Wang, K. R. Ledesma [et al.] // *Bioanalysis. Future Medicine Ltd.*– 2020.– Vol. 12.– № 7.– P. 2020–0007.

47. A validated LC–MS/MS method for the quantification of piperacillin/tazobactam on dried blood spot / S. Barco, F. M. Risso, M. Bruschettoni [et al.] // *Bioanalysis.*– 2014.– Vol. 6.– № 21.– P. 2795–2802.

48. A Validated UHPLC–MS/MS Method to Quantify Eight Antibiotics in Quantitative Dried Blood Spots in Support of Pharmacokinetic Studies in Neonates / Q. Liu, L. Liu, Y. Yuan, [et al.] // *Antibiotics*.– 2023.– Vol. 12.– P. 199.
49. Abarca, R. Development and Validation of an LC–MS/MS Assay for the Quantitative Analysis of Alprazolam, α –Hydroxyalprazolam and Hydrocodone in Dried Blood Spots / R. Abarca, R. Gerona, R. // *J. Chromatogr. B*.– 2023.– Vol. 1220.
50. Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process. / R. Zakaria, K. J. Allen, J. J. Koplín [et al.] // *EJIFCC. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*.–2016.– Vol. 27.– № 4.– P. 288–317.
51. Amsterdam P. Van. The application of dried blood spot sampling in global clinical trials / P. Van. Amsterdam // *Bioanalysis*.– 2014
52. An Ultra–High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for the Quantification of Vancomycin Requiring Only μ L of Rabbit Serum / V. Schmitt, A. Szeits, T. Klassen, U. Häfeli // *Am. J. Anal. Chem. Scientific Research Publishing, Inc*.– 2017.– Vol. 08.– № 09.– P. 553–563.
53. An ultra–performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method to quantify vancomycin in human serum by minimizing the degradation product and matrix interference / Y. Fan, X. Peng, J. Yu [et al.] // *Bioanalysis*.– 2019.– Vol. 11.– № 10.– P. 941–954.
54. Analysis of cyclosporin A, tacrolimus, sirolimus, and everolimus in dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry / J. C. Burger, A. J. Wilhelm, A. Chahbouni [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.– 2012.– Vol. 404.– № 6–7.– P. 1803–1811.
55. Analysis of tacrolimus and creatinine from a single dried blood spot using liquid chromatography tandem mass spectrometry / D.R. Koop, L. A. Bleye, M. Munar [et al.] // *J Chromatogr B Anal. Technol Biomed Life Sci*.– 2013.– Vol. 926.– P. 54–61.

56. Analytical and Clinical Validation of Assays for Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) of Drugs in Different Blood Matrices: A Literature Review. / R.V. Nugraha, V. Yunivita, P. Santoso, [et al.] // *Molecules*.– 2023.– 28, 6046.– <https://doi.org/10.3390/molecules28166046>

57. Analytical and clinical validation of a dried blood spot assay for the determination of paclitaxel using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry / N.B. Andriguetti, R.Z. Hahn, L..F Lizot, [et al.] // *Clin Biochem*.– 2018.– Apr;54.– P. 123–30.

58. Application and Validation of Simple Isocratic HPLC–UV–DAD Method with Dual Wavelength Detection for Ivabradine Determination and Its Application in the Study of Stress Degradation / J. Nowakowska, P. Pikul, M. Marszałł, K. Ciura // *J. Chem. Hindawi Limited*.– 2017.

59. Application of Dried Urine Spots for Non-Targeted Quadrupole Time-of-Flight Drug Screening / F. Stöth, M. Fabritius, W. Weinmann, // *Anal. Toxicol*. 2023.– Vol. 47.– P. 332–337.

60. A volumetric absorptive microsampling LC–MS/MS method for five immunosuppressants and their hematocrit effects / R. A. Koster, P. Niemeijer, H. Veenhof, [et al.] // *Bioanalysis*.– 2019.– Vol.11.– P. 495–508.

61. Bressán, I.G. Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab Validation of a simple liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of tacrolimus , sirolimus , everolimus and cyclosporin A in dried matr. / I.G. Bressán, M.I. Giménez, S.F. Llesey // *J Mass Spectrom Adv Clin Lab*.– 2021.– Vol. 19.– P. 7–19. doi:10.1016/j.jmsacl.2021.01.003

62. Börsch–Supan, A. Dried blood spot samples and their validation / A. Börsch–Supan, M. Börsch–Supan, L.M. Weiss // *Health and socio-economic status over the life course*. De Gruyter.– 2019.– P. 349–358.

63. Determination of oxycodone and its major metabolites in haematic and urinary matrices: Comparison of traditional and miniaturised sampling approaches. M. Protti, M.C. Catapano; B.G. Samolsky Deke / *Pharm. Biomed*.

Anal. // 2018.– P 204–214.

64. Buchwald A., Winkler K., Epting T. Validation of an LC–MS/MS method to determine five immunosuppressants with deuterated internal standards including MPA // BMC Clin. Pharmacol. BioMed Central.– 2012.– Vol. 12.– № 1.– P. 2.

65. Buchwald, A. Validation of an LC–MS/MS method to determine five immunosuppressants with deuterated internal standards including MPA / A. Buchwald, K. Winkler, T. Epting T. // BMC Clin. Pharmacol. BioMed Central.– 2012.– Vol. 12.– № 1.– P. 2.

66. Chace, D.H. Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns / D.H. Chace, T.A. Kalas, E.W. Naylor // Clinical Chemistry.– 2003.– Vol. 49.– № 11.– P. 1797–1817.

67. Chernonosov, A. A. The Use of Dried Blood Spots for the Quantification of Antihypertensive Drugs / A. A. Chernonosov // Int. J. Anal. Chem.– 2018

68. Clinical application of a dried blood spot assay for sirolimus and everolimus in transplant patients / H. Veenhof, R.A. Koster, J–WC. Alffenaar [et al.] // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) .– 2019.– Vol. Nov 26;57(12).– P. 1854–62.

69. Comparative Analysis of Ampicillin Plasma and Dried Blood Spot Pharmacokinetics in Neonates / J. Le, B. Poindexter , J. E. Sullivan [et al.] // Ther Drug Monit.– 2018.– Vol. 40(1).– P. 103–108.

70. Comparing Dried Blood Spots and Plasma Concentrations for Busulfan Therapeutic Drug Monitoring in Children / A. Dilo, Y. Daali, J. Desmeules [et al.] // Ther. Drug Monit.– 2020.– Vol. 42.– № 1.– P. 111–117.

71. Coombs, R.W. Processing of Dried Blood Spots / R.W. Coombs, P. Investigator, S. Fiscus // Standard Operating Procedure.– 2012.– P. 1–20.

72. Correction for the hematocrit bias in dried blood spot analysis using a nondestructive, single–wavelength reflectance–based hematocrit prediction method / S. Capiou S, L.S. Wilk, P.M.M. De Kesel PMM // Anal Chem.– 2018.– Vol. 90

(3) .– P. 1795– 1804.

73. Concentration Determination of >200 Proteins in Dried Blood Spots for Biomarker Discovery and Validation / A. Eshghi, A.J. Pistawka, J. Liu, [et al.] // *Mol. Cell. Proteom.*– 2020.– Vol. 19.– P. 540–553.

74. Deprez, S. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressants and Creatinine from a Single Dried Blood Spot Using the Capitainer qDBS Device / S. Deprez, K. Van Uytvanghe, C.P. Stove // *Anal. Chim.*– 2023.– Vol. 1242

75. Desai, J.M. Dried blood spot sampling analysis: Recent advanced and applications / J.M. Desai, R.P. Ravindra // *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*– 2013.– Vol. 4.– № 4.– P. 34–44.

76. Detection of 26 Drugs of Abuse and Metabolites in Quantitative Dried Blood Spots by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry / T. Meikopoulos, H. Gika, G. Theodoridis [et al.] // *Molecules.*– 2023.– Vol. 29. 975. 10.3390/molecules29050975.

77. Determination of Antidepressants and Antipsychotics in Dried Blood Spots (DBSs) Collected from Post–Mortem Samples and Evaluation of the Stability over a Three–Month Period. / M. Moretti, F. Freni, B. Valentini, [et al.] // *Molecules.*– 2019.– Vol. 24, E3636, doi:10.3390/molecules24203636

78. Determination of Benzodiazepines in Blood and in Dried Blood Spots Collected from Post–Mortem Samples and Evaluation of the Stability over a Three–Month Period / M. Moretti, F. Freni, I. Tomaciello, [et al.] // *Drug Test. Anal.*– 2019.– Vol. 11.– P. 1403–1411.

79. Determination of free and total piperacillin–tazobactam in plasma by HPLC–MS–MS: An adapted method for neonates / Z. Li Q. Li, Y. Wang [et al.] // *Chromatographia.*– 2012.– Vol. 75.– № 9–10.– P. 533–539.

80. Determination of the Effectiveness of Antibiotic Therapy by Conducting Therapeutic Drug Monitoring / A.M. Kazanova, M. Chenkurov, A. A. Kopaylo [et al.] // *Antibiot. Chemother.*– 2020.– Vol. 65.– № 3–4.– P. 29–33

81. Determination of vancomycin content in dried blood spots for

therapeutic drug monitoring / M. Al-Ghazawi, N. Daound, K. Hadidi, M. Alzweiri [et al.] // *Acta Pol. Pharm. – Drug Res. Polish Pharmaceutical Society.*– 2021.– Vol. 78.– № 1.– P. 3–10.

82. Determination of 6–thioguanine and 6–methylmercaptapurine in dried blood spots using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: method development, validation and clinical application / K. Lampič, J. Trontelj, H. Prosen // *Clin Chim Acta.*– 2019.– Dec;499.– P. 24–33.

83. Determination of irinotecan and its metabolite SN–38 in dried blood spots using high–performance liquid–chromatography with fluorescence detection / R.Z. Hahn, P.C. Arnhold, N.B. Andriguetti, [et al.] // *J Pharm Biomed Anal.*– 2018.– Feb;150.– P. 51–8.

84. Determination of voriconazole in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application in therapeutic drug monitoring in Chinese patients / W. Alhussaini, E. Ghane, M. Alsahly [et al.] // *J. Int. Med. Res.*– 2019.– Vol. 48.– № 3.

85. Development and validation of a quantitative HPLC/MS/MS method for the determination of piperacillin in blood plasma / V. I. Petrov, I. S. Anikeev, T. E. Zayachnikova [et al.] // *Research Results in Pharmacology.* – 2023. – Vol. 9, No. 2. – P. 55–59. – DOI 10.18413/rrpharmacology.9.10027. – EDN MIJZXF.

86. Development and validation of a dried blood spot assay for the quantification of ribavirin using liquid chromatography coupled to mass spectrometry / L. C. Jimmerson, Jia–Hua Zheng, L. R. Bushman [et al.] // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*– 2015.– P. 1–19.

87. Development and Validation of a HPLC–MS/MS Method for Simultaneous Determination of Twelve Bioactive Compounds in Epimedium: Application to a Pharmacokinetic Study in Rats / M. Sun, Y. Yanwei, W. Juan [et al.] // *Molecules.* MDPI AG.– 2018.– Vol. 23.– № 6.– P. 1322.

88. Development and validation of a sensitive LC–MS/MS–ESI method for the determination of ivabradine in human plasma: Application to a pharmacokinetic study / J. Jiang, L. Tian, Y. Huang, Y. Li // *Biomed.*

Chromatogr.– 2013.– Vol. 27.– № 12.– P. 1603–1608.

89. Development and validation of an analytical method using UPLC–MS/MS to quantify everolimus in dried blood spots in the oncology setting / L. M. Knapen, Y. de Beer, R. J. M. Brüggemann [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.– 2018.– P. 106–113

90. Development and validation of method for quantitative determination of sildenafil and n–desmethyl sildenafil by HPLC–MS/MS in human blood plasma / I. Kuznetsov, S. E. Mohammed, H. .S Boshra, M. H. Abdelmula [et al.] // *Sci. Pharm. Sci.*– 2017.– Vol. 0.– № 1 (5).– P. 22–32.

91. Development and validation of pomalidomide determination in human plasma by HPLC–MS/MS method / T.N. Komarov, I. E. Shohin, M. A. Tokareva [et al.] // *Drug Dev. Regist. Center of Pharmaceutical Analytics*.– 2020.– Vol. 9.– № 4.– P. 146–154.

92. Developmental pharmacokinetics of piperacillin and tazobactam using plasma and dried blood spots from infants. / M. Cohen–Wolkowicz, K. M. Waat, C. Zhou [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.*– 2014 May.– 58(5).– P 2856–65. doi: 10.1128/AAC.02139–13.

93. Development and validation of a volumetric absorptive microsampling– liquid chromatography mass spectrometry method for the analysis of cefepime in human whole blood: Application to pediatric pharmacokinetic study / G.S. Moorthy, C. Vedar, N.R. Zane [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.*– 2020.– Vol. 179.

94. Development and validation of hematocrit level measurement in dried blood spots using near–infrared spectroscopy / D. van de Velde, J.L. van der Graaf, M. Boussaidi [et al.] // *Ther Drug Monit.*– 2021.– Vol. 43.– P. 351– 357. doi:10.1097/FTD.0000000000000834

95. Development of a dried blood spot sampling method towards therapeutic monitoring of radotinib in the treatment of chronic myeloid leukaemia / J. Lee, S.Y. Jung, M. Choi [et al.] // *J Clin Pharm Ther.*– 2020.– Oct;45(5) .– P. 1006–13.

96. Deprez, S. Application of a Fully Automated Dried Blood Spot Method for Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressants: Another Step Toward Implementation of Dried Blood Spot Analysis / S. Deprez, C. Stove C // Arch Pathol Lab Med.– 2023.– Vol. 1.– P. 786–796. doi: 10.5858/arpa.2021–0533–OA. PMID: 36191344.

97. Dp, S.K. Development and validation of a dried blood spot lc–ms / ms assay to quantify gemcitabine in human whole blood : a comparison with and without cytidine deaminase inhibitor / S.K. Dp, C. Palavan, S.R.A.O. Jvln // Int. J. Pharm. Pharm. Sci.– 2015.– Vol. 7.– № 8.

98. Dried blood spot analysis for the quantification of vancomycin and creatinine using liquid chromatography – tandem mass spectrometry: Method development and validation. / Bahmany S [et al.] // Clin Chim Acta.– 2024.– Jan 15;553:117689. doi: 10.1016/j.cca.2023.117689.

99. Dried Blood Spots (DBS): A suitable alternative to using whole blood samples for diagnostic testing of visceral leishmaniasis in the post–elimination era / P. Ghosh , R. Chowdhury, M. A. Rahat, [et al.] // PLOS Neglected Tropical Diseases.– 2023.– Vol. 17(10) <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011680>

100. Dried Blood Spot in Laboratory: Directions and Prospects / K. Malsagova, A. Kopylov, A. Stepanov, [et al.] // Diagnostics.– 2020.– Vol. 10.

101. Dried Blood Spot Technique Applied in Therapeutic Drug Monitoring of Anticancer Drugs: a Review on Conversion Methods to Correlate Plasma and Dried Blood Spot Concentrations / V. Iacuzzi, B. Posocco, M. Zanchetta [et al.] // Pharm. Res.– 2021.– Vol. 38.– № 5.– P. 759–778.

102. Dried Blood Spot sampling in psychiatry: Perspectives for improving therapeutic drug monitoring / L.C. Martial, R.E. Aarnoutse, M. Mulder, [et al.] // Eur. Neuropsychopharmacol.– 2017.– Vol. 27.– P. 205–216.

103. Dried Blood Spot Technique–Based Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method as a Simple Alternative for Benznidazole Pharmacokinetic Assessment / DC Galindo Bedor [et al.] // Antimicrob Agents Chemother.– 2018.– Nov.– 62(12) e00845–18. doi: 10.1128/AAC.00845–18.

PMID: 30275095; PMCID: PMC6256767.

104. Dried Blood Spot Tests for the Diagnosis and Therapeutic Monitoring of HIV and Viral Hepatitis B and C / E. Tuailon, D. K. , A. Pison [et al.] // *Front. Microbiol. Frontiers Media S.A.*– 2020.– Vol. 11.– P. 373.

105. Dried blood spot validation of five immunosuppressants, without hematocrit correction, on two LC–MS/MS systems / R.A. Koster H. Veenhof, R. Botma [et al.] // *Bioanalysis. Future Medicine Ltd.*– 2017.– Vol. 9.– № 7.– P. 553–563.

106. Dried blood spot: Utilising dry blood for pharmacokinetic investigations – An old method with great future for therapeutic drug monitoring / S. Goločorbin–Kon, M. Mikov, J. Cvejic [et al.] // *Vojnosanit. Pregl. Inst. Sci. inf., Univ. Defence in Belgrade.*– 2018.– Vol. 75.– № 12.– P. 1222–1225.

107. Dried blood spot analysis for therapeutic drug monitoring of antipsychotics: drawbacks of its clinical application / S.M. Kloosterboer, B.C.M. de Winter BCM, S. Bahmany [et al.] // *Ther Drug Monit.*– 2018.– Vol. 40.– P. 344–350.

108. Evaluation of dried blood spots as alternative sampling material for serological detection of anti–SARS–CoV–2 antibodies using established ELISAs / H. Weisser, K. Steinhagen, R. Höcker [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med. De Gruyter Open Ltd.*– 2021.– Vol. 59.– № 5.– P. 979–985.

109. Evaluation of a novel micro–sampling device, Mitra™, in comparison to dried blood spots, for analysis of praziquantel in *Schistosoma haematobium*–infected children in rural Côte d’Ivoire / J. Kovač, G. Panic, A. Neodo, // *J. Pharm. Biomed. Anal.*– 2018.– Vol.151.– P. 339–346

110. Evaluation of dried blood spot sampling for clinical metabolomics: Effects of different papers and sample storage stability / O. P. Trifonova, D. L. Maslov, E. E. Balashova, P. G. Lokhov [et al.] // *Metabolites. MDPI AG.*– 2019.– Vol. 9.– № 11.

111. FDA Guid. Evaluation of Internal Standard Responses During Chromatographic Bioanalysis: Questions and Answers Guidance for Industry

Biopharmaceutics Evaluation of Internal Standard Responses During Chromatographic Bioanalysis: Questions and Answers Guidance for Industry / Center for Drug Evaluation and Research.– 2019.– Vol. 1.– № September.– P. 1–9.

112. Guide to achieving reliable quantitative LC–MS measurements RSC : Sargent M. [et al.] / Analytical Methods Committee First Edition 2013 Editor.– 2013.

113. Gunasingham J. Dried Blood Spot Fatty Acid Quantitation : Developing Methods for Determining Unknown Volumes , Identifying Contaminants and Assessing Fatty Acid Stability During Storage / Gunasingham J ; Waterloo, Ontario, Canada.– 2018

114. Hagihara, M. Development of HPLC methods for the determination of vancomycin in human plasma, mouse serum and bronchoalveolar lavage fluid / M. Hagihara, C. Sutherland, D.P. Nicolau // J. Chromatogr. Sci.– 2013.– Vol. 51.– № 3.– P. 201–207.

115. Henion, J. Microsample analyses via DBS : challenges and opportunities / J. Henion, R. V. Oliveira, D. H. Chace // Bioanalysis.– 2013.– P. 2547–2565.

116. Implementing Dried Blood Spot Sampling for Clinical Pharmacokinetic Determinations: Considerations from the IQ Consortium Microsampling Working Group / C. Evans, M. Arnold, P. Bryan [et al.] // AAPS Journal. Springer New York LLC.– 2015.– Vol. 17.– № 2.– P. 292–300.

117. Investigation of the Relationship between Phenylalanine in Venous Plasma and Capillary Blood Using Volumetric Blood Collection Devices / R.S. Carling, Z. Barclay, N. Cantley, [et al.] // JIMD Rep.– 2023.– Vol. 64.– P. 468–476

118. Jann, M. W. Applied Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Psychopharmacological Agents / M. W. Jann, S. R. Penzak, L. J. Cohen. – 2016 doi:10.1007/978-3-319-27883-4

119. Jennifer, T. Pham. Challenges of Vancomycin Dosing and Therapeutic Monitoring in Neonates / T. Pham. Jennifer // *Pediatr Pharmacol Ther.* – 2020. – Vol. 25. – № 6. – P. 759–778. – doi: 10.5863/1551–6776–25.6.476.

120. Kacargil, C.U. Determination of Illicit Drugs in Dried Blood Spots by LC–MS/MS Method: Validation and Application to Real Samples / C.U. Kacargil, N. Daglioglu, I.E. Goren, // *Chromatographia.* – 2020. – Vol. 83. – P. 885–892.

121. Kalyani, L. Stability indicating RP–HPLC method development and validation of cefepime and amikacin in pure and pharmaceutical dosage forms / L. Kalyani, C.V.N. Rao // *J. Pharm. Sci.* – 2018. – Vol. 54. – № 3. – P. 17–258.

122. Klak, A. Preanalytical considerations in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants with dried blood spots / A. Klak, S. Pauwels, P. Vermeersch // *Diagnosis (Berlin, Germany). NLM (Medline).* – 2019. – Vol. 6. – № 1. – P. 57–68.

123. Krnáč, D. A new HPLC–MS/MS method for simultaneous determination of Cyclosporine A, Tacrolimus, Sirolimus and Everolimus for routine therapeutic drug monitoring / D. Krnáč, K. Reiffová, B. Rolinski // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. Elsevier.* – 2019. – Vol. 1128. – № August. – P. 121–772.

124. Kocur, A. Volumetric Absorptive Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs—From Sampling and Analytical Issues to Clinical Application / A. Kocur, A. T. Pawinski. – *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – 24. – 681.

125. Kumar, P.P. Evaluation of dried blood spot technique for pharmacokinetic study of hydrochlorothiazide and comparison of human plasma versus dried blood spot / P.P. Kumar, T. Murthy // *J. Young Pharm.* – 2015. – № June 2014.

126. Lakshmy R. Role of dried blood spots in health and disease diagnosis in older adults / R. Lakshmy, M. Tarik, R. A. Abraham // *Bioanalysis.* – 2014. – Vol. 6. – № 23. – P. 3121–3131

127. Lei, B.U.W, A review of microsampling techniques and their social

impact / B.U.W. Lei, T.W. Prow // *Biomed.– Microdevices.*– 2019.– 21.–81.

128. Li F. Will ‘ green ’ aspects of dried blood spot sampling accelerate its implementation and acceptance in the pharmaceutical industry / F. Li // *Bioanalysis.*– 2012.– P. 1259–1261.

129. Li, W. Dried blood spot sampling in combination with LC–MS/MS for quantitative analysis of small molecules / W. Li, F.L.S. Tse // *Biomed. Chromatogr.*– 2010.– Vol. 24.– № 1.– P. 49–65.

130. Limited sampling strategy for prolonged–release tacrolimus in renal transplant patients by use of the dried blood spot technique / G.A.J. Van Boekel, A. R. T. Donders, K. E. J. Hoogtanders [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* Springer Verlag.– 2015.– Vol. 71.– № 7.– P. 811–816.

131. Linder C. Possibilities of Dried Blood Spots As a Matrix in Therapeutic DrugMonitoring of Antiepileptic Drugs in Children : The thesis is defended at C1:87 / Camilla Linder ; Karolinska University Hospital, Huddinge.– 2019.

132. Liu, M. A novel method for the determination of vancomycin in serum by high–performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application in patients with diabetic foot infections / M. Liu, Z.H. Yang, G.H. Li // *Molecules.*– 2018.– Vol. 23.– № 11.– P. 1–12.

133. Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry for Broad–Spectrum Drug Screening of Dried Blood Spot as MicrosamplingProcedure / T. Joye, J. Sidibé, J. Déglon, [et al.] // *A. Anal. Chim. Acta.*– 2019.– Vol. 1063.– P. 110–116.

134. Lim, M.D. Dried Blood Spots for Global Health Diagnostics and Surveillance: Opportunities and Challenges / M.D.Lim // *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*– 2018.– Vol. 99(2) .– P. 256–265. doi:10.4269/ajtmh.17–0889

135. Londhe, V. Opportunities and obstacles for microsampling techniques in bioanalysis: Special focus on DBS and VAMS. / V. Londhe, M. Rajadhyaksha, // *J. Pharm. Biomed. Anal.*– 2020.– Vol. 182.

136. Management of urinary tract infection in solid organ transplant recipients: Consensus statement of the Group for the Study of Infection in Transplant Recipients (GESITRA) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) / E. Vidal, C. Cervera, E. Cordero [et al.] // *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*– 2015.– Vol. 33.– № 10.– P. 679

137. Managing psychotropic medications in complex, real-world patients using comprehensive therapeutic drug monitoring / J.J. Sutherland, R.D. Morrison, J.S. Daniels [et al.] // *ACS Chem. Neurosci.*– 2017.– № 8.– 1641–1644. DOI: 10.1021/acchemneuro.7b00209

138. Martial L.C., Aarnoutse R.E., Schreuder M.F., Henriët S.S., Brüggemann R.J.M., Joore M.A. (2016) Cost Evaluation of Dried Blood Spot Home Sampling as Compared to Conventional Sampling for Therapeutic Drug Monitoring in Children / L.C. Martial, R.E. Aarnoutse, M.F. Schreuder, [et al.] // *PLoS ONE.*– Vol. 11(12).– <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167433>

139. Meesters, R.J.W. new ultrafast and high-throughput mass spectrometric approach for the therapeutic drug monitoring of the multi-targeted anti-folate pemetrexed in plasma from lung cancer patients / R.J.W. Meesters, R. Cornelissen // *Anal. Bioanal. Chem.*– 2010.– Vol. 398.– № December.– P. 2943–2948.

140. Mercolini, L. Editorial: Advances in therapeutic drug monitoring of psychiatric subjects: Analytical strategies and clinical approaches / L. Mercolini // *Front. Psychiatry.*– 2022.– Vol. 13.

141. Microsampling Assays for Pharmacokinetic Analysis and Therapeutic Drug Monitoring of Antimicrobial Drugs in Children: A Critical Review / G.S. Moorthy, C. Vedar, K.J. Downes [et al.] // *Ther. Drug Monit.*– 2021.– Vol. 43.– P. 335–345.

142. Mu, A. The Application of Dried Blood Spots in Toxicokinetic and Pharmacokinetic Studies / A. Mu // *J. Chem. Inf. Model.*– 2019.– Vol. 53.– № 9.– P. 1689–1699.

143. Muzembo, B. A. Systematic review with meta-analysis: performance

of dried blood spots for hepatitis C antibodies detection / B. A. Muzembo, N. C. Mbendi, S. F. Nakayama // *Publ Health.* – 2017. – Vol. 153.– P. 128–36.

144. Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders: Methodologies for Measurement of Enzymatic Activities in Dried Blood Spots / M.H. Gelb, Z. Lukacs, E. Ranieri, [et al.] // *Int. J. Neonatal Screen.* 2019. – 5. – Vol. 1, doi:10.3390/ijns501000

145. Niemiec, A. Dried blood spot in toxicology: Current knowledge / A. Niemiec // *Separations.* – 2021. – Vol. 8. – № 9. – P. 4–9.

146. Near-infrared-based hematocrit prediction of dried blood spots: an in-depth evaluation / L. Delahaye, L. Heughebaert L, [et al.] // *Clin Chim Acta.* – 2021.– Vol. 523.– P. 239– 246

147. Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot-Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring / S. Capiiau, H. Veenhof, R. A. Koster [et al.] // *Ther. Drug Monit.* – 2019. – Vol. 41. – № 4. – P. 409–430.

148. Optimization of vancomycin dosing in very low-birth-weight preterm neonates / T. Madigan, C. B. Teng, J. Koshaish [et al.] // *American Journal of Perinatology.* – 2015.–Vol. 32(1). – № Jan. – P. 83–6.

149. Pablo, A. Automated Analysis of Dried Urine Spot (DUS) Samples for Toxicology Screening / A. Pablo, A.R. Breaud, W. Clarke, *Clin.Biochem.*– 2020.– Vol. 75.– P. 70–77.

150. Pham, J. T. Challenges of Vancomycin Dosing and Therapeutic Monitoring in Neonates. / Pham JT. // *J Pediatr Pharmacol Ther.* – 2020.– Vol 25(6)– P. 476–484. doi: 10.5863/1551–6776–25.6.476.

151. Pharmacokinetics of Albendazole, Albendazole Sulfoxide, and Albendazole Sulfone Determined from Plasma, Blood, Dried Blood Spots, and Mitra Samples of Hookworm-Infected Adolescents / J.D. Schulz, A. Neodo, J.T. Coulibaly, J. Keiser, // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2019.– Vol 63.

152. Population pharmacokinetic meta-analysis of individual data to design the first randomized efficacy trial of vancomycin in neonates and young

infants / E. Jacqz-Aigrain, S. Leroux, A. H. Thomson [et al.] // *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019 Aug 1; 74(8):2128–38.

153. Practice guidelines for therapeutic drug monitoring of vancomycin: A consensus review of the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring / K. Matsumoto, Y. Takesue, N. Ohmagari [et al.] // *J. Infect. Chemother. Japanese Society for Cancer Chemotherapy*.– 2013.– Vol. 19.– № 3.– P. 365–380.

154. Prasad, S.S. Development of simple and robust RP–HPLC method for determination of everolimus and its impurities in oral solid dosage form / S.S. Prasad, G. V. Krishna Mohan, A. Naga Babu // *Asian J. Chem.*– 2019.– Vol. 31.– № 5.– P. 1002–1008.

155. Precise, accurate and user–independent blood collection system for dried blood spot sample preparation / R. Neto, A. Gooley, M. Breadmore [et al.] // *Anal Bioanal Chem.*– 2018.– Vol. 410.– P. 3315–3323.

156. Quantification of antiretroviral drugs in dried blood spot samples by means of liquid chromatography / tandem mass spectrometry / T. Koal, H. Burhenne, R. Römling [et al.] // *Rapid Commun Mass Spectrom.*– 2005.– №21 P. 2995–3001.

157. Quantification of Cefepime, Meropenem, Piperacillin, and Tazobactam in Human Plasma Using a Sensitive and Robust Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method, Part 1: Assay Development and Validation / D’Cunha Ronilda, N. C. T. C. Bedor, J. W. Yiturimo da Silva [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.– 2018.– Vol. 62.– № 9.

158. Quantification of piperacillin, tazobactam, meropenem, ceftazidime, and linezolid in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry / S. Barco, R. Bandetinni, A. Maffia [et al.] // *J. Chemother. Taylor & Francis*. – 2015. – Vol. 27.– № 6.– P. 343–347.

159. Quantification of the immunosuppressant tacrolimus on dried blood spots using LC–MS/MS / T. Shokati, N. Bodenberger, H. Gadpaille // *J. Vis. Exp. Journal of Visualized Experiments*.– 2015.– Vol. 2015.– № 105.

160. Quantitation of Tenofovir and Emtricitabine in Dried Blood Spots (DBS) with LC–MS/MS / Jia–Hua Zheng 1, Louis A Guida, Caitlin Rower [et al.] // *J Pharm Biomed Anal.* – 2015. – P. 1–23.
161. Quantitative Determination of Ivabradine and Its N–Demethylated Metabolite in Volunteer Blood and Urine / L.A. Smirnova, B. E. Tolkachev, A. F. Ryabukha [et al.] // *Pharm. Chem. J.*– 2019.– Vol. 53.– № 3.– P. 275–278.
162. Quantification of the immunosuppressant tacrolimus on dried blood spots using LC–MS/MS / Shokati T. [et al.] // *J. Vis. Exp. Journal of Visualized Experiments.* – 2015.– Vol. 2015.– № 105.
163. Quraishi, R. The Use of Dried Blood Spot Samples in Screening Drugs of Abuse / R. Quraishi, R. Jain, A. Ambekar // *Pharmacology & Pharmacy.*– 2013.– Vol. 2013.– № April.– P. 152–159.
164. Review of DBS methods as a quantitative tool for anticancer drugs / S.P. Sulochana, P. Daram, N. R. Srinivas, R. Mullangi // *Biomed. Chromatogr.*– 2019.– Vol. 33.– № 1.
165. Safety, efficacy, and tolerability of lacosamide for the treatment of epilepsy in pediatric patients in Uygur, China / T. Zhao, Hong–Jian Li, L. Ma // *Epilepsy Behav.*– 202. – doi:10.1016/j.yebeh.2021.107814
166. Sánchez–Nava, L. A. Pharmaceutical equivalence and similarity studies of glibenclamide tablets / L. A. Sánchez–Nava, U. Bautista–Sánchez, A. L. Robles–Piedras // *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences.*– 2019.– Vol 07(01).– P. 096–101.
167. Shipkova, M. Therapeutic Drug Monitoring of Antibiotic Drugs: The Role of the Clinical Laboratory / M. Shipkova, H. Jamoussi // *Ther Drug Monit.*– 2022.– Vol. 1.– № 44.– P. 32–49.
168. Simões, S. Dried blood spots combined to an UPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of drugs of abuse in forensic toxicology / S. Simões, A. Ajenjo, M.J. Dias // *J. Pharm. Biomed. Anal.*– 2018.– Vol. 147.– P. 634–644, doi:10.1016/j.jpba.2017.02.04
169. Simultaneous determination of ivabradine and N–desmethyivabradine

in human plasma and urine using a LC–MS/MS method: application to a pharmacokinetic study / Cheng–tao Lu, Yan–yan Jia, J. Yang // *Acta Pharmaceutica Sinica B.*– 2012.– Vol. 2.– № 2.– P. 205–212.

170. Stability indicating RP–HPLC method development and validation of cefepime and amikacin in pure and pharmaceutical dosage forms / Rao C.V.N. [et al.] // *J. Pharm. Sci.*– 2018.– Vol. 54.– № 3.– P. 17–258.

171. Stability of metabolite profiles using dried blood spot cards / S. D. McCulloch, E. D. Karoly, M. W. Mitchell [et al.] // *Metabolon Inc.* – 2021.

172. Stability of metabolites in dried blood spots stored at different temperatures over a 2–year period / P. Prentice, C. Turner, M.C. Wong, R.N. Dalton // *Bioanalysis.* – 2013.– Jun;5(12).– P. 1507–14. doi: 10.4155/bio.13.121.

173. State of the science in dried blood spots / J.D. Freeman., L. M. Rosman, J. F. Ratcliff [et al.] // *Clinical Chemistry. American Association for Clinical Chemistry Inc.*– 2018.– Vol. 64.– № 4.– P. 656–679.

174. Suyagh, M. Development and validation of a dried blood spot–HPLC assay for the determination of metronidazole in neonatal whole blood samples / M. Suyagh, P.S. Collier, H.L. Halliday // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – № November 2015.

175. Tarik M. Role of dried blood spots in health and disease diagnosis in older adults / Tarik M., Abraham R. // *Bioanalysis.* – 2017. – № December 2014.

176. Tenofovir, emtricitabine, and tenofovir diphosphate in dried blood spots for determining recent and cumulative drug exposure / J.R. Castillo–Mancilla, J. H. Zheng, J. E. Rower [et al.] // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 2013. – Vol. 29.– № 2.– P. 384–390.

177. Thalakada, R. Development and Validation of a Novel Vancomycin Dosing Nomogram for Achieving High–Target Trough Levels at 2 Canadian Teaching Hospitals / R. Thalakada // *Can J Hosp. Pharm.*– 2012.– Vol. 65(3).– P.180–187

178. Therapeutic drug monitoring of amikacin in septic patients / W. Duszynska, F. S. Taccone, M. Hurkacz [et al.] // *Crit. Care.* – 2013. – Vol. 17. –

№ 4.

179. Therapeutic drug monitoring of ciclosporin A and tacrolimus in heart–lung transplant patients using dried blood spots / E. Hinchliffe, J. Adaway, J. Fildes [et al.] // *Ann. Clin. Biochem.* SAGE Publications Ltd. – 2014.– Vol. 51.– № 1.– P. 106–109.

180. Therapeutic drug monitoring of everolimus: A consensus report / M. Shipkova, D. A. Hesselink, D. W. Holt [et al.] // *Therapeutic Drug Monitoring.*– 2016.– Vol. 38.– № 2.– P. 143–169.

181. Therapeutic drug monitoring of lacosamide among children: is it helpful? / E. Kohn, M. Lezinger, S. Daniel [et al.] // *Front. Pharmacol.*– 2023.– doi: 10.3389/fphar.2023.1164902

182. Therapeutic drug monitoring of meropenem in neonate with necrotizing enterocolitis: A Challenge Steven / S. De Keukeleire, D. Borrey, W. Decaluwe, M. Reynders // *Case Rep. Infect. Dis.* Hindawi Limited. – 2016.– Vol. 2016.– P. 1–3.

183. Therapeutic Drug Monitoring of Piperacillin and Tazobactam by RP–HPLC of Residual Blood Specimens HHS Public Access / S. M. Verhoven, J. J. Groszek, William H. F. [et al.] // *Clin Chim Acta.* – 2018.– Vol. 482.– P. 60–64.

184. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus and mycophenolic acid in outpatient renal transplant recipients using a volumetric dried blood spot sampling device / T. C Zwart, S. R. M. Gokoel, P. J. M. van der Boog // *Br. J. Clin. Pharmacol.* Blackwell Publishing Ltd. – 2018. – Vol. 84.– № 12.– P. 2889–2902.

185. Therapeutic drug monitoring of vancomycin and voriconazole by liquid chromatography–tandem mass spectrometric method / Y. Li, Y. Lei, L. Yanhua [et al.] // *Chem. Res. Chinese Univ.*– 2017.– Vol. 33.– № 3.– P. 339–342.

186. Therapeutic drug monitoring–based dose optimisation of piperacillin/tazobactam to improve outcome in patients with sepsis (TARGET): a prospective, multi–centre, randomised controlled trial / S. Hagel, S. Fiedler, A. Hohn [et al.] // *Trials.* – 2019.– Vol. 20.– № 1.– P. 330.

187. Therapeutic drug monitoring of anti–epileptic drugs—A clinical

verification of volumetric absorptive micro sampling / T.P.I.J.M. Canisius; J.W.P.H. Soons, P. Verschuure, P. [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2020. – Vol. 58.– P. 828–835.

188. Towards rational dosing algorithms for vancomycin in neonates and infants based on population pharmacokinetic modeling / E. J. Janssen, P. A. Väitalo, K. Allegaert [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2016. – P. 1013 – 1021.

189. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: part I. / A. Krueve, R. Rebane, K. Kipper [et al.] // *Anal Chim Acta.* – 2015.– Apr 22.– P. 29–44. doi: 10.1016/j.aca.2015.02.017.

190. Usman, M. Development and validation of an HPLC method for the determination of vancomycin in human plasma and its comparison with an immunoassay (PETINIA) / M. Usman, G. Hempel // *Springerplus. SpringerOpen.* – 2016.– Vol. 5.– № 1.– P. 1–7.

191. Validation and application of a dried blood spot assay for biofilm–active antibiotics commonly used for treatment of prosthetic implant infections / B. Knippenberg, M. Page–Sharp, S. Salman [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology.* – 2016. Vol. 60. – № 8.– P. 4940–4955.

192. Vancomycin and creatinine determination in dried blood spots: Analytical validation and clinical assessment / L. Scribel, A. P. Zavascki, D. Matos [et al.] // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2020.– Vol. 1137.

193. Vancomycin pharmacokinetic model development in patients on intermittent online hemodiafiltration / N. Westra, J. H. Proost, C. F. M. Franssen [et al.] // *PLoS One / ed. Barretti P. Public Library of Science.*– 2019.– Vol. 14.– № 5.

194. Velghe, S. Evaluation of the Capitainer–B Microfluidic Device as a New Hematocrit–Independent Alternative for DriedBlood Spot Collection / S. Velghe, C.P. Stove // *Anal. Chem.*– 2018.– Vol. 90.– P. 12893–12899.

195. Velghe, S. Dried blood spots in therapeutic drug monitoring and

toxicology / S. Velghe, R. De Troyer, C. Stove // Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology.– 2018.– Vol. 14.– № 1.– P. 1–3.

196. Vila M.M.D.C. Analytical methods for vancomycin determination in biological fluids and in pharmaceuticals / M.M.D.C. Vila, M. M. Concales, M. Tubino// Quimica Nova.– 2007.– Vol. 30.– № 2.– P. 395–399.

197. Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) technology for IGF–1 quantification by automated chemiluminescent immunoassay in dried blood / A. Marchand, I. Roulland, F. Semence, M. Audran // Growth Horm. IGF Res.– 2019.– 50.–P. 27–34.

198. Volumetric absorptive microsampling for the quantification of tacrolimus in capillary blood by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry / C. Tron, M.J. Ferrand–Sorre, J. Querzerho–Raguideau, [et al.] // J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. – 2021.

199. Wilhelm A.J., den Burger J.C.G., Swart E.L. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions // Clinical Pharmacokinetics.– 2014.– Vol. 53.– № 11.– P. 961–973.

200. Wilhelm, A. J. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot : Progress to Date and Future Directions / A. J. Wilhelm, J.C. G. den Burger, E.L. Swart // Clin Pharmacokinet.– 2014. – Vol. 53. – № 11.– P. 961–973.

201. William C. Clinical Challenges in Therapeutic Drug Monitoring / C. William, A. Dasgupta: Special Populations, Physiological Conditions, and Pharmacogenomics.– 2016.– P.360