

*На правах рукописи*

**АНИКЕЕВ ИВАН СЕРГЕЕВИЧ**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО  
ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА  
«ВЫСУШЕННОЙ КАПЛИ»**

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

г. Волгоград, 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:** заведующий кафедрой клинической фармакологии и интенсивной терапии, Заслуженный деятель науки РФ, Заслуженный врач РФ, академик РАН, д.м.н., профессор  
**Петров Владимир Иванович**

**Научный консультант:** заведующий лабораторией фармацевтических аналитических исследований, д.б.н.  
**Смирнова Людмила Андреевна**

**Официальные оппоненты:**

**Бондарева Ирина Борисовна**, доктор биологических наук, профессор кафедры общей и клинической фармакологии медицинского института федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы".

**Пересыпкина Анна Александровна**, доктор биологических наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

**Ведущее учреждение:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г. в \_\_\_\_\_ ч. на заседании Диссертационного Совета Д 21.2.005.02 ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России по адресу 400066, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ([www.volgmed.ru](http://www.volgmed.ru)) ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
доктор медицинских наук, доцент

Ольга Викторовна Шаталова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) является одним из общепризнанных подходов к повышению эффективности и безопасности фармакотерапии за счёт оптимизации выбора и режима дозирования лекарственных препаратов на основании изучения профиля концентраций действующих веществ и/или их метаболитов в различных биологических матрицах пациентов (Батурин В. А. и др. 2016).

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 (Осешнюк Р. А. и др. 2017).

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 (Velghe, S., 2018).

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) (Wilhelm A. J. et al., 2014).

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 лабораторию. 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 (Nugraha R.V. 2023, Londhe, V. 2020).

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 (Крюков Е.В. 2021).

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 (Крюков Е.В. 2021).

### **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 (Ширяева М.В. и др., 2013).

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 (Кузнецов К.А. и др., 2013).

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 (Толкачев Б. Е., и др., 2021). 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 (Zakaria R. et al., 2016).

### **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, пиперециллин, 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, пиперециллина, 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 (Kocur, A. 2023):

- 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 нарушенной функцией 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 ВЭЖХ-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 ЕМА (European Medicines Agency).

### **Положения, выносимые на защиту:**

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 отличие 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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**В главе 1** представлен обзор литературы, в котором отражена суть технологии «высушенной капли». Приведены преимущества и существующие ограничения данной технологии для широкого её применения в терапевтическом лекарственном мониторинге препаратов с узким терапевтическим диапазоном. Степень разработанности данной методики и влияние специфических валидационных параметров на результаты количественного определения лекарственных препаратов в цельной крови человека.

**В главе 2** отражены материалы и методы исследования, использованные при выполнении диссертационной работы.

Первый этап работы включал анализ существующих методик определения выбранных лекарственных препаратов, по результату которого был сформирован план разработки методов количественного определения лекарственных препаратов с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

Второй этап включал разработку, оптимизацию и валидацию методик количественного хромато-масс-спектрометрического анализа ванкомицина, пиперациллина, эверолимуса и ивабрадина с использованием стандартных методов подготовки проб и метода «высушенной капли».

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».

Разработка методов количественного определения лекарственных препаратов проводилась в плазме крови с использованием преципитации белков в качестве метода проподготовки и в цельной крови используя технологию «высушенной капли».

В первом случае плазма получена из цельной крови центрифугированием в течение 15–20 мин. Полученную плазму переносили с помощью пипетки в пробирки, куда добавляли растворы препаратов различной концентрации для получения калибровочных образцов и образцов контроля качества. Дальнейшую пробоподготовку осуществляли, добавляя к образцам ацетонитрил в отношении 1:3, преципитаты центрифугировались после чего пипеткой отбирают супернатант и перенесли его в хроматографические вials.

Для анализа лекарственных препаратов с помощью метода «высушенной капли», подготовили образцы цельной крови с определенным значением гематокрита. Для этого в цельную кровь добавляют плазму или эритроциты, предварительно полученные путем центрифугирования крови. Далее в цельную кровь добавляют растворы препаратов различной концентрации для получения калибровочных образцов и образцов контроля качества, которые после наносили на фильтровальную бумагу и сушили при комнатных условиях в течение 3 часов (рис. 1).

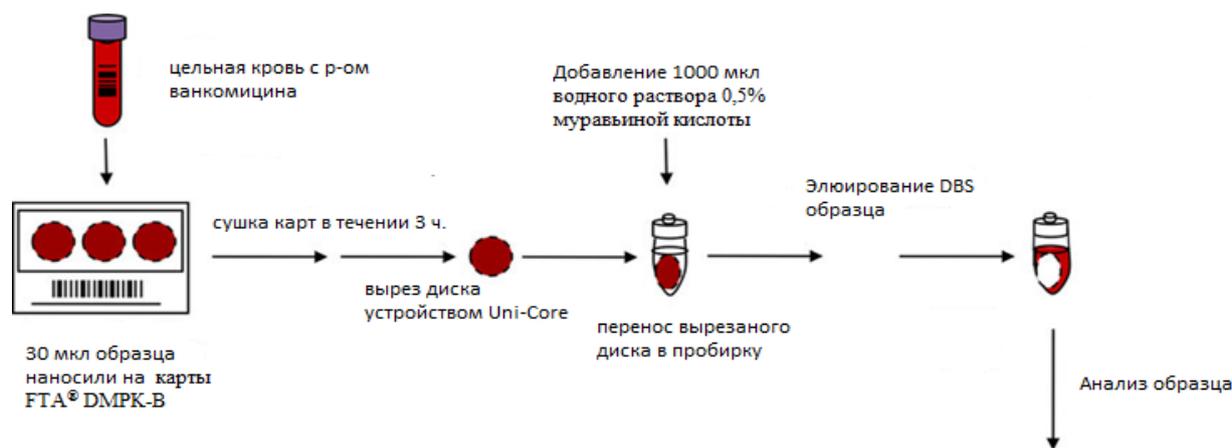


Рисунок 1. Схема пробоподготовки, используя метод «высушенной капли».

После сушки, с помощью устройства Uni-Core производили вырез дисков с нанесенными образцами из фильтровальной карты и переносили их в пробирки для экстракции. После чего проводили экстракцию образцов «высушенной капли» соответствующим экстрагентом для последующего анализа.

Концентрации калибровочных растворов соответствовали: 1 - 1000 нг/мл для ивабрадина, 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 на четырех концентрационных уровнях: нижний предел количественного определения (НПКО), QCL - Low level (нижний концентрационный уровень), QCM - Medium level (средний концентрационный уровень) и QCH - high level (верхний концентрационный уровень). 0,5; 1,5; 50 и 75 мкг / мл 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 разработки ВЭЖХ-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 «Руководством по экспертизе лекарственных средств» Том I, а также с руководствами FDA (U.S. Food and Drug Administration) и EMA (European Medicines Agency) по следующим показателям: стабильность, селективность, линейность, правильность, прецизионность, матричный эффект. А также по специфическим показателям, характерным только для метода «высушенной капли»: эффект объема капли, эффект гематокрита, однородность капли.

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.

При валидации однородности капли сравнили результаты образцов контроля качества при нижнем и верхнем уровне концентраций, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и с края. Анализ проводился в 5 сериях.

Эффект гематокрита оценивали на 3-х уровнях гематокрита (0,3; 0,4; 0,5), при 2 концентрационных уровнях в 5 сериях.

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.

Уровень согласованности между разработанным ВЭЖХ-МС/МС методом для способа «высушенной капли» и традиционным методом со стандартным способом пробоподготовки, исследовали с использованием графиков Бланда-Алтмана.

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 отправляются в программное обеспечение Analyst.

В главе 3 представлена разработка протоколов взятия, хранения, анализа и валидации образцов «высушенной капли». Были разработаны надлежащие протоколы взятия и хранения образцов «высушенной капли» из пальца для взрослых пациентов и из пятки для новорожденных детей.

Были разработаны валидационные протоколы, которые описывают не только валидационные параметры характерные для стандартных способов пробоподготовки и традиционных матриц (табл. 1), но и специфические параметры, характерные только для этой новой технологии (табл. 2).

#### Валидационные протоколы для метода «высушенной капли крови»:

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

Таблица 2. Специфические параметры валидации методов количественного определения лекарственных препаратов.

Валидационный параметр	Проводимые испытания	Критерии приемлемости
Эффект объёма капли	5 образцов КК 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 КК для 3-х уровней гематокрита, при 2 концентрационных уровнях	$\leq 15\%$ от номинальных значений
Однородность капли	Сравниваются 5 образцов КК на 2-х уровнях концентраций образцов КК при 3-х уровнях гематокрита, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и у края.	$\leq 15\%$ от номинальных значений

Данные методики взятия, хранения, анализа и валидации ванкомицина были успешно апробированы на базе ГУЗ Клинической больницы №5 отдела неонатологии у новорожденных, для которых применялась терапия данным лекарственным препаратом.

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

Представлены результаты разработки и анализа выбранных лекарственных препаратов в образцах «высушенной капли» и образцах плазмы крови. При разработке условий масс-спектрометрической детекции искомым веществ методом мониторинга множественных реакций (MRM) были определены ионы-«предшественники» и соответствующие им ионы-«продукты» лекарственных препаратов (рис. 2). Выбраны оптимальные условия масс-спектрометрической детекции. Были оптимизированы условия хроматографического разделения, выбран режим элюирования, состав мобильной фазы, скорость потока, модификатор мобильной фазы (рис. 3).

#### Разработка и валидация ВЭЖХ-МС/МС методов количественного определения ванкомицина

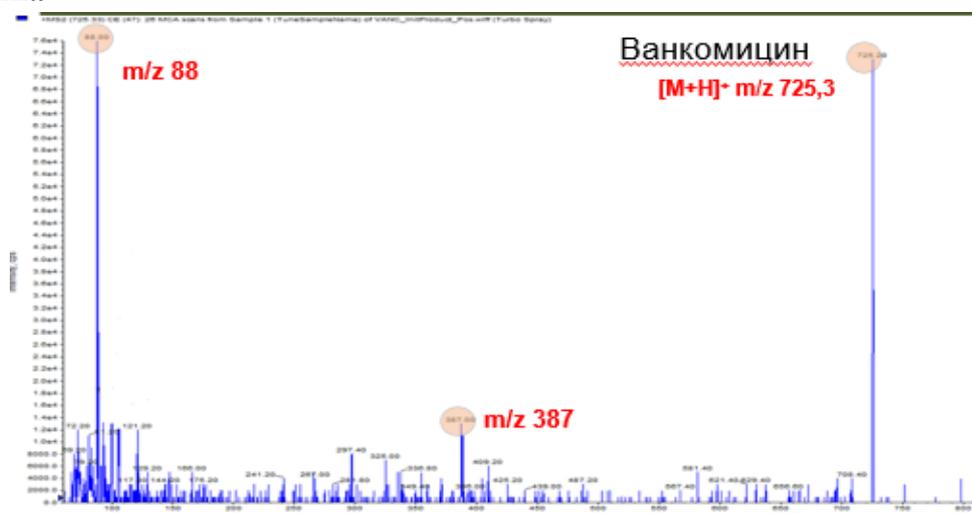


Рисунок 2. Масс-спектр ванкомицина в плазме крови: по оси абсцисс – время  $m/z$  (Da), по оси ординат – интенсивность сигнала.

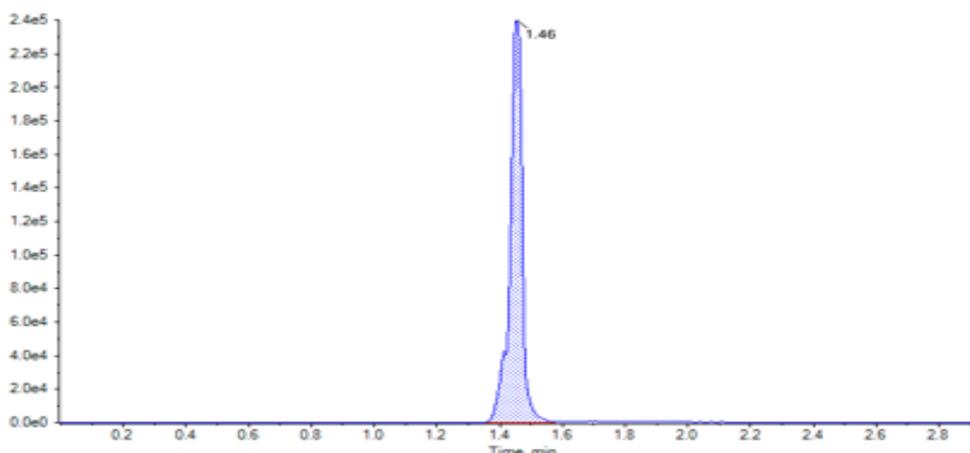


Рисунок 3. Хромато-масс-спектрограмма ванкомицина в «высушенной капли»: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

### Валидация

Была произведена валидация разработанных методик количественного ВЭЖХ-МС/МС определения лекарственных препаратов в плазме крови по стандартным протоколам валидации и в цельной крови с использованием метода «высушенной капли» по новым, разработанным протоколам валидации. Результаты валидации представлены ниже. (Табл. 3, 4, 5)

Таблица 3. Таблица валидационных параметров количественного определения ванкомицина для метода с использованием в качестве пробоподготовки преципитацию белков

Параметр		Значение			
		LLOQ (1 мг/мл)	QCL (7,5 мг/мл)	QCM (35 мг/мл)	QCN (75 мг/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				

Таблица 4. Таблица валидационных параметров для метода с использованием в качестве пробоподготовки «высушенную каплю крови».

Параметр		Значение			
		LLOQ (1 мкг/мл)	QCL (7,5 мкг/мл)	QCM (35 мкг/мл)	QCN (75 мкг/мл)

Прецизионность (CV %)	Внутри цикла	2,7	2,1	2,7	3,7
	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			

Таблица 5. Влияние гематокрита на результаты анализа ВЭЖХ-МС/МС определения ванкомицина.

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

Относительная погрешность рассчитанных концентраций при валидации эффекта объёма капли не имела различий более — 15%.

Рассчитанные концентрации ванкомицина в образцах DBS после 14 дней хранения находились в диапазоне от 85,4–87,5% от номинальных.

Относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не превышала 15%.

**Разработка и валидация ВЭЖХ-МС/МС методов количественного определения пиперациллина.**

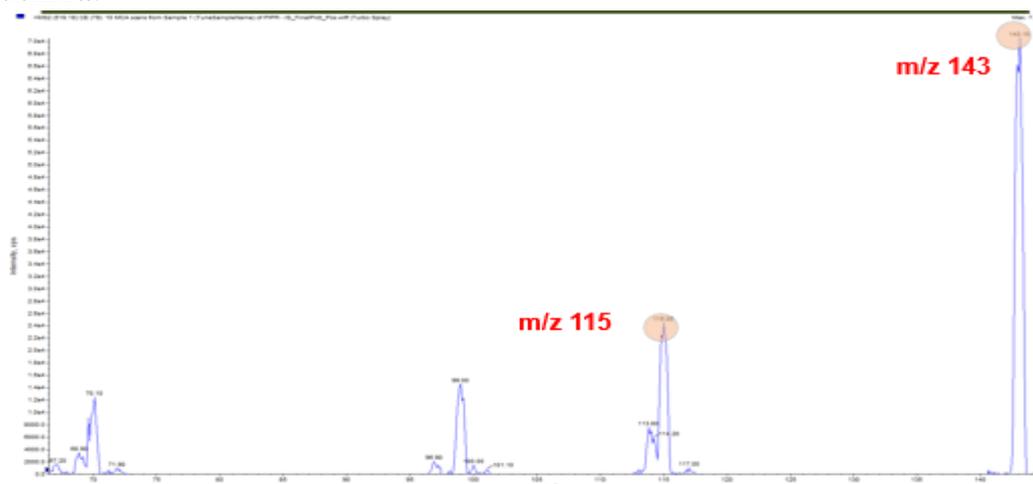


Рисунок 4. Масс-спектр пиперациллина в плазме крови: по оси абсцисс – время  $m/z$  (Da), по оси ординат – интенсивность сигнала.

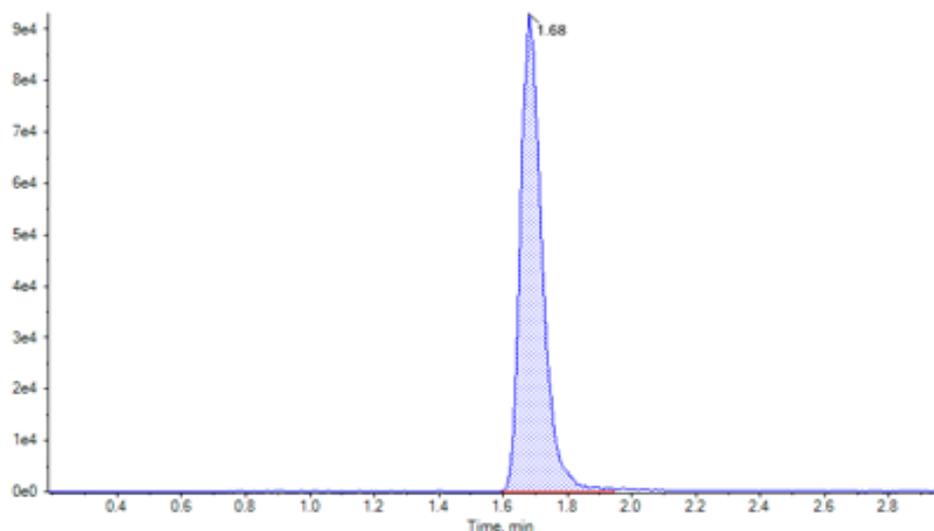


Рисунок 5. Хромато-масс-спектрограмма пиперациллина в образцах «высушенной капли крови»: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

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

Параметр		Значение			
		LLOQ (0,5 мг/мл)	QCL (1,5 мг/мл)	QCM (50 мг/мл)	QCH (75 мг/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				

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

Параметр		Значение			
		LLOQ (0,5 мкг/мл)	QCL (1,5 мкг/мл)	QCM (50 мкг/мл)	QCH (75 мкг/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			

Таблица 8. Влияние гематокрита на результаты анализа ВЭЖХ-МС/МС определения пиперациллина.

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

Относительная погрешность рассчитанных концентраций при валидации эффекта объёма капли не имела различий более — 15%.

Рассчитанные концентрации пиперациллина в образцах DBS после 14 дней хранения находились в диапазоне от 89,0–95,4% от номинальных.

Относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не превышала 15%.

**Разработка и валидация ВЭЖХ-МС/МС методов количественного определения ивабрадина.**

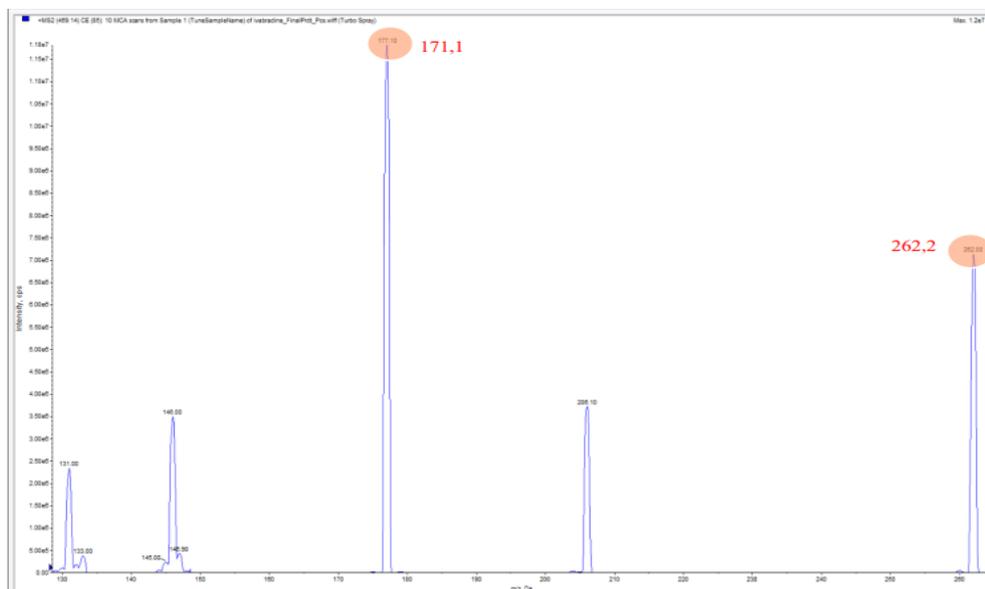


Рисунок 6. Масс-спектр ивабрадина в плазме крови: по оси абсцисс – время  $m/z$  (Da), по оси ординат – интенсивность сигнала

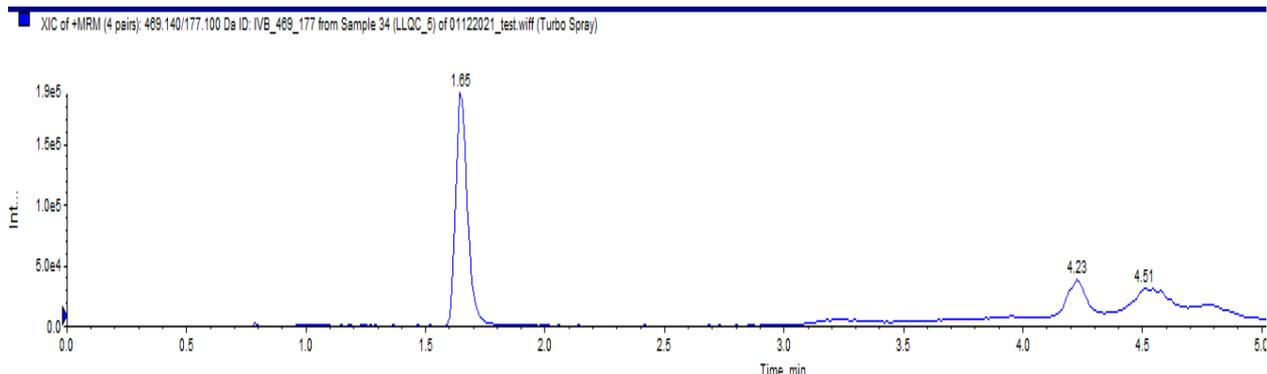


Рисунок 7. Хромато-масс-спектрограмма ивабрадина в образцах «высушенной капли крови»: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

Таблица 9. Таблица валидационных параметров количественного определения ивабрадина для метода с использованием в качестве пробоподготовки преципитацию белков.

Параметр		Значение			
		LLOQ (1 нг/мл)	QCL (3 нг/мл)	QCM (25 нг/мл)	QCN (40 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			

Таблица 10. Таблица валидационных параметров для метода с использованием в качестве пробоподготовки «высушенную каплю крови».

Параметр		Значение			
		LLOQ (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			

Таблица 11. Влияние гематокрита на результаты анализа.

Гематокрит %	QC	Номинальная концентрация (нг/мл)	Точность (%)
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

Относительная погрешность рассчитанных концентраций при валидации эффекта объёма капли не имела различий более — 15%.

Рассчитанные концентрации ивабрадина в образцах DBS после 14 дней хранения находились в диапазоне от 87,2–93,8% от номинальных.

Относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не превышала 15%.

Ранее уже проводилось фенотипирования CYP3A4 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».<sup>1</sup>

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 затратна по ресурсу и по времени.

**Разработка и валидация ВЭЖХ-МС/МС методов количественного определения эверолимуса.**

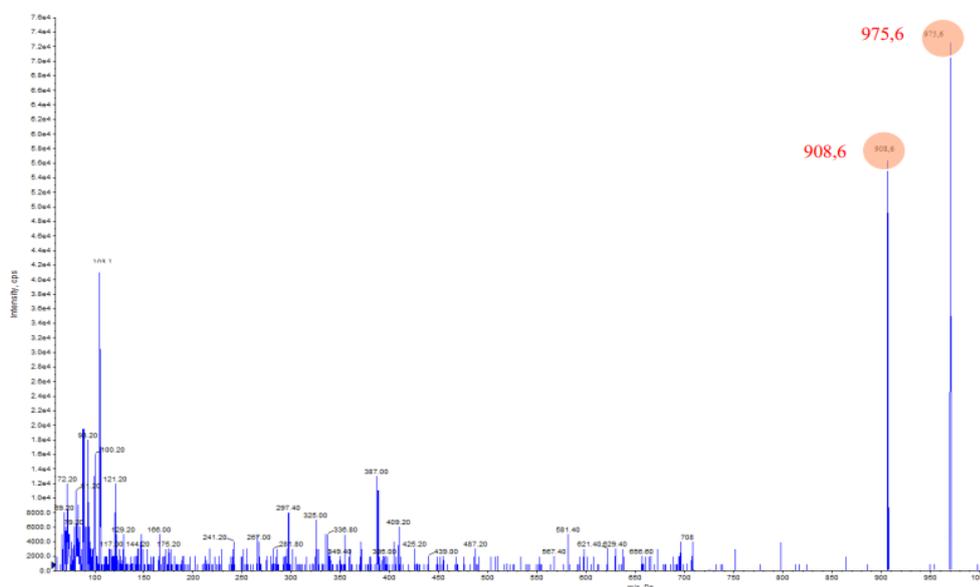


Рисунок 8. Масс-спектр эверолимуса в плазме крови: по оси абсцисс – время  $m/z$  (Da), по оси ординат – интенсивность сигнала

<sup>1</sup> Определение метаболического отношения N-деметиывабрадин/ 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.

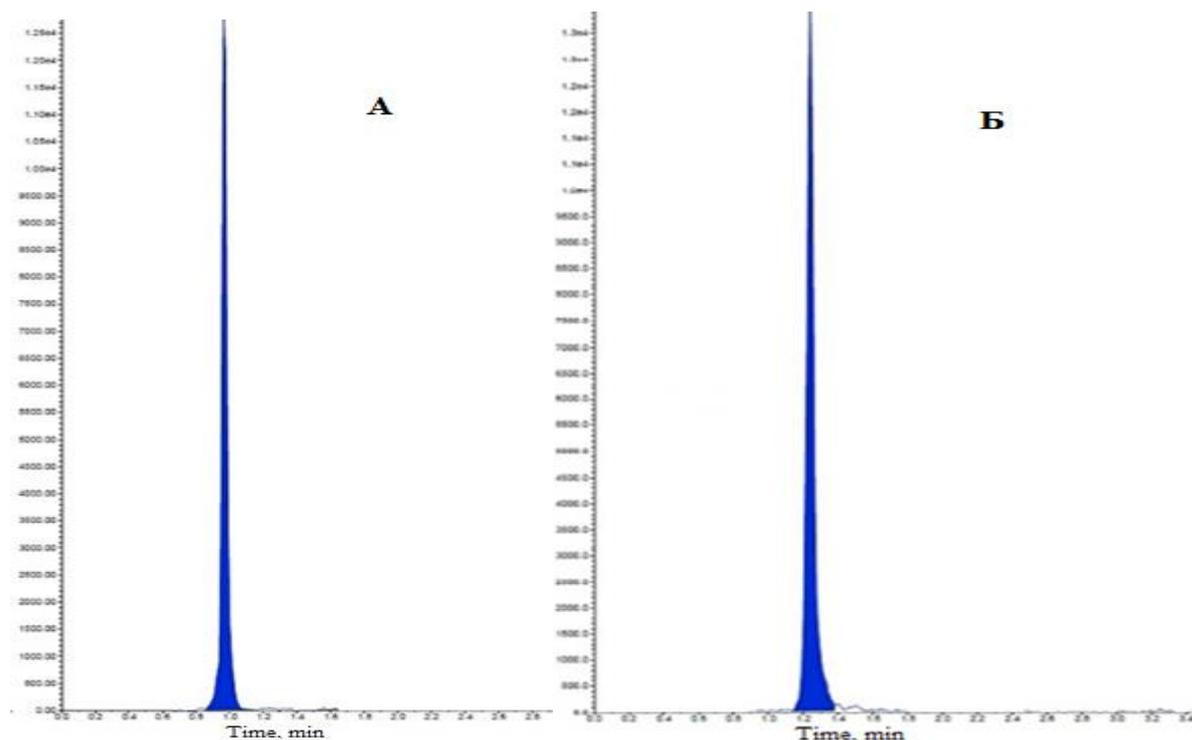


Рисунок 9. Хромато-масс-спектрограмма эверолимуса в плазме крови (А), и в образцах «высушенной капли» (Б): по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

Таблица 12. Таблица валидационных параметров количественного определения эверолимуса для метода с использованием в качестве пробоподготовки преципитацию белков.

Параметр		Значение			
		LLOQ (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			

Таблица 13. Таблица валидационных параметров для метода с использованием в качестве пробоподготовки «высушенную каплю крови».

Параметр	Значение			
	LLOQ (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			

Таблица 14. 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

Относительная погрешность рассчитанных концентраций при валидации эффекта объёма капли не имела различий более — 15%.

Рассчитанные концентрации эверолимуса в образцах DBS после 14 дней хранения находились в диапазоне от 89,4–96,1% от номинальных.

Относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не превышала 15%.

Приведен сравнительный анализ полученных данных о концентрации лекарственных средств в образцах «высушенной капли крови» и образцах плазмы 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.

Для сравнения были использованы образцы «высушенной капли крови» полученные от новорожденных из ГУЗ Клинической больницы №5, отделения неонатологии. (Рис. 10).

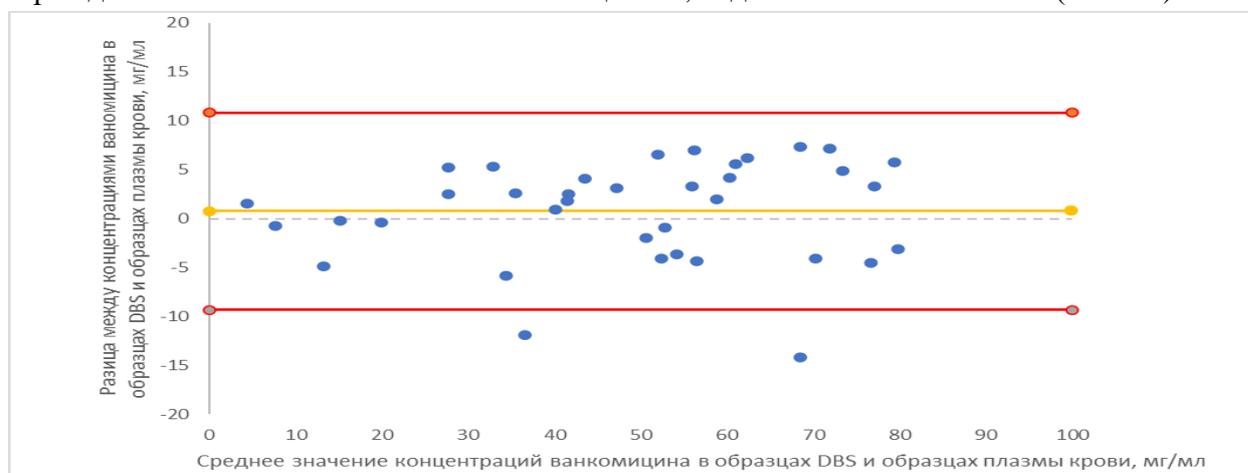


Рисунок 10. Сравнение двух методов пробоподготовки по Блэнду-Алтману для ванкомицина.

## 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 отличие 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.

6. 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 объеме. 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.

### **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 отличие 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 °С. Проведенная оценка специфических параметров валидации не показала влияние на результат анализа и соответствуют критериям приемлемости.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных Минобрнауки РФ**

1. 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. – DOI 10.24412/2071-5315-2021-12327. – EDN MKLMZB.

2. 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.

3. 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

4. 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.

5. 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.

6. 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.

### Статьи в журналах и сборниках материалов конференций:

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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 медицинский университет, 2018. – С. 522. – EDN YYWJAT.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ВПКО – верхний предел количественного определения  
 ВЭЖХ-МС/МС - с тандемным масс-спектрометрическим детектированием  
 ЕАЭС - Евразийский экономический союз  
 ЛП — лекарственный препарат  
 ЛС — лекарственное средство  
 МС - масс-спектрометрия  
 НПР - неблагоприятная (нежелательная) побочная реакция  
 НПКО — нижний предел количественного определения  
 ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг  
 DBS – Dried Blood Spot (высушенная капля крови)  
 ЕМА — European Medicines Agency (Европейское медицинское агенство)  
 FDA - Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов)  
 MRM - Multiple reaction monitoring (Мониторинг множественных реакций)  
 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)

**АНИКЕЕВ ИВАН СЕРГЕЕВИЧ**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО  
ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА  
«ВЫСУШЕННОЙ КАПЛИ»**

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук