

УДК 615.074



Оптимизация терапевтического лекарственного мониторинга ванкомицина у новорожденных с применением метода «высушенной капли крови»

В.И. Петров¹, И.С. Аникеев^{1,2}, Т.Е. Заячникова³, А.В. Стрыгин^{1,2}, Д.В. Куркин^{1,2}, Ю.С. Казьмина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

² Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,
400087, Россия, г. Волгоград, ул. Новороссийская, д. 39

³ Институт непрерывного медицинского и фармацевтического образования федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

E-mail: Anikeev.iv@gmail.com

Получена 31.07.2023

После рецензирования 15.10.2023

Принята к печати 30.10.2023

Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) используется для повышения индивидуализации фармакотерапии, особенно у групп пациентов с высокой межиндивидуальной вариабельностью фармакокинетических (ФК) параметров. Одной из таких групп пациентов являются новорожденные дети, для которых лекарственная терапия, особенно препаратами с узким терапевтическим диапазоном, вызывает ряд трудностей или не может быть применена в принципе.

Цель. Разработка и валидация методов количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ванкомицина в образцах «высушенной капли крови» с использованием новых протоколов и сравнение полученных данных с результатами в образцах плазмы с использованием стандартных методов пробоподготовки.

Материалы и методы. Для приготовления маточных и стандартных растворов ванкомицина и норванкомицина как внутреннего стандарта использовали сухие навески соответствующих сертифицированных стандартов ванкомицина (Servier, Франция) и норванкомицина (Augsburg, Германия, степ. чистоты >95,0%). Хроматографическое разделение компонентов проводили на колонке Poroshell 120 C18 (4,6×50 мм, 2,7 мкм). При разработке условий масс-спектрометрической детекции искомых веществ методом мониторинга множественных реакций (MRM) были определены ионы-предшественники и соответствующие им ионы-продукты.

Результаты. Разработана и валидирована методика количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ванкомицина в образцах «высушенной капли». Провели сравнение между значениями концентраций ванкомицина в образцах «высушенной капли крови» и образцах плазмы. При этом более 95% рассчитанных средних концентраций находились в пределах d-2s и d+2s, которые соответствовали значениям –10,2 и 12,2, что подтверждало пригодность разработанного метода для анализа образцов пациентов.

Заключение. Полученные результаты позволяют рекомендовать метод «высушенной капли крови» для проведения терапевтического мониторинга ванкомицина, дополнительных исследований ФК у данной группы пациентов с последующим применением данного лекарственного препарата у новорожденных и пациентов детского возраста.

Ключевые слова: терапевтический лекарственный мониторинг; ванкомицин, ВЭЖХ/МС; валидация; биоаналитика; метод «высушенной капли крови»

Список сокращений: ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг; ФК – фармакокинетика; ФД – фармакодинамика; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; МС – масс-спектрометрия; НПКО – нижний предел количественного определения; КК – контроль качества; DBS – метод «высушенной капли крови».

Для цитирования: В.И. Петров, И.С. Аникеев, Т.Е. Заячникова, А.В. Стрыгин, Д.В. Куркин, Ю.С. Казьмина. Оптимизация терапевтического лекарственного мониторинга ванкомицина у новорожденных с применением метода «высушенной капли крови». *Фармация и фармакология*. 2023;11(4):280-290. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-4-280-290

© В.И. Петров, И.С. Аникеев, Т.Е. Заячникова, А.В. Стрыгин, Д.В. Куркин, Ю.С. Казьмина, 2023

For citation: V.I. Petrov, I.S. Anikeev, T.E. Zayachnikova, A.V. Strygin, D.V. Kurkin, Yu.S. Kazmina. Optimization of therapeutic drug monitoring of vancomycin in newborns using "Dried Blood Spot" method. *Pharmacy & Pharmacology*. 2023;11(4):280-290. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-4-280-290

Optimization of therapeutic drug monitoring of vancomycin in newborns using “Dried Blood Spot” method

V.I. Petrov¹, I.S. Anikeev^{1,2}, T.E. Zayachnikova³, A.V. Strygin^{1,2}, D.V. Kurkin^{1,2}, Yu.S. Kazmina¹

¹ Volgograd State Medical University,

1, Pavshih Borcov Sq., Volgograd, Russia, 400131

² Center for Innovative Medicines with Pilot Industrial Production of Volgograd State Medical University,
39, Novorossiyskaya Str., Volgograd, Russia, 400087

³ Institute of Continuing Medical and Pharmaceutical Education of Volgograd State Medical University,
1, Pavshih Borcov Sq., Volgograd, Russia, 400131

E-mail: Anikeev.iv@gmail.com

Received 31 July 2023

After peer review 15 Oct 2023

Accepted 30 Oct 2023

Therapeutic drug monitoring (TDM) is used to increase the individualization of pharmacotherapy, especially in patient groups with a high interindividual variability in pharmacokinetic (PK) parameters. One of these groups of patients is newborn children, for whom drug therapy, especially drugs with a narrow therapeutic range, causes a few difficulties or cannot be used in principle.

The aim of the work was to develop and validate quantitative HPLC-MS/MS methods for the determination of vancomycin in “dried blood spot” samples using new protocols and comparison of the results obtained with the results in plasma samples using standard sample preparation methods.

Materials and methods. To prepare stock and standard solutions of vancomycin and norvancomycin as an internal standard, dry portions of the corresponding certified standards of vancomycin (Servier, France) and norvancomycin (Augsburg, Germany, purity grade >95.0%) were used. A chromatographic separation of the components was carried out on a Poroshell 120 C18 column (4.6×50 mm, 2.7 μm). When developing conditions for a mass spectrometric detection of the desired substances using the multiple reaction monitoring (MRM) method, precursor ions and their corresponding product ions were determined.

Results. A quantitative HPLC-MS/MS method for the determination of vancomycin in «dried blood spot» samples was developed and validated. A comparison was made between vancomycin concentrations in «dried blood spot» samples and plasma samples. Moreover, more than 95% of the calculated average concentrations are within the limits of $d-2s$ and $d+2s$, which correspond to the values of -10.2 and 12.2 . That confirms the suitability of the developed method for the analysis of patient samples.

Conclusion. The results obtained make it possible for us to recommend the “dried blood spot” method for therapeutic monitoring of vancomycin, additional studies of PK in this group of patients with subsequent use of this drug in newborns and pediatric patients.

Keywords: therapeutic drug monitoring; vancomycin; HPLC/MS; validation; bioanalytics; dried blood spot method

Abbreviations: TDM – Therapeutic Drug Monitoring; PK – pharmacokinetics; PD – pharmacodynamics; HPLC – high performance liquid chromatography; MS – mass spectrometry; LLOQ – lower limit of quantitation; QC – quality control; DBS – Dried Blood Spot.

ВВЕДЕНИЕ

Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) используют для повышения индивидуализации фармакотерапии, особенно у групп пациентов с высокой межиндивидуальной вариабельностью фармакокинетических (ФК) параметров [1]. К таким пациентам относят в том числе и новорожденных, для которых лекарственная терапия, особенно препаратов с узким терапевтическим диапазоном, сопряжена с рядом трудностей или не может быть применена в принципе [2, 3].

Особенно часто назначаемыми препаратами для новорожденных являются антибиотики. Около 2,5% доношенных детей получают антибиотикотерапию в первые 3 дня жизни. Однако следует учитывать, что набор различных физиологических и аутоиммунных особенностей у данной группы пациентов влияет на ФК лекарственных препаратов и может привести к неэффективной фармакотерапии и

развитию нежелательных последствий, а скрытые или явные особенности организма диктуют необходимость индивидуального подхода с тенденцией к минимизации воздействий (минимальная доза, минимальное количество введений). Это особенно усложняет применение антибиотиков с узким диапазоном между минимальной терапевтической и токсической концентрациями. Одним из таких препаратов является ванкомицин, который назначается при лечении тяжелых инфекций, вызванных грамположительными бактериями, например золотистым стафилококком (особенно метициллин-резистентными штаммами), коагулазонегативным стафилококком и ампициллин-резистентными видами *Enterococcus* [2, 4].

Некоторые факторы, определяющие внутри- и межиндивидуальную вариабельность, такие как возраст, масса, состояние почек влияют на ФК

и, как следствие, на фармакодинамические (ФД) параметры ванкомицина. Это вызывает необходимость проведения ТЛМ данной группы пациентов, ФК анализа и создание популяционных ФК моделей, в которых учитывают клинически значимые особенности новорожденных и их влияние на ФК ванкомицина [1, 4].

Совокупность особенностей данной группы пациентов не позволяет провести масштабные и полноценные исследования ФК и ТЛМ. Так как стандартные способы отбора биообразцов не оптимальны в силу объективных этических и логистических ограничений у новорожденных и маленьких детей, возникает необходимость разработки и апробации новых подходов, оптимизации ТЛМ, построение ФК моделей и методов сбора биообразцов, в том числе для проведения ТЛМ. Перспективным направлением в данной области можно считать метод «высушенной капли крови», который широко применяют, к примеру, для скрининга наследственных заболеваний у новорожденных [1, 5, 6].

Ранее нами уже был разработан и валидирован метод количественного ВЭЖХ–МС/МС определения ванкомицина в образцах плазмы крови [7] и подготовлены протоколы по сбору, анализу и валидации образцов «высушенной капли крови» [5]. В связи с этим в данном исследовании нами были применены данные методы.

ЦЕЛЬ. Разработка и валидация методики количественного определения ванкомицина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией в образцах «высушенной капли крови» с использованием новых протоколов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Этическая экспертиза

Дизайн и протоколы исследования, образцы информированного согласия для законных представителей пациентов были приняты, а затем рассмотрены и одобрены на заседании Локального этического комитета Волгоградского государственного медицинского университета (регистрационный № IRB00005839 IORG 0004900 (ONRP)), о чем свидетельствует выписка из протокола № 39 от 28 июня 2022 г.

Химические вещества и реагенты

Для приготовления маточных и стандартных растворов ванкомицина и норванкомицина как внутреннего стандарта использовали: высокоочищенную воду, которую получали в системе Milli-Q, муравьиную кислоту для ВЭЖХ–МС (Scharlab, Испания), ацетонитрил (Scharlab, Испания), а также сухие навески соответствующих сертифицированных стандартов ванкомицина (Servier, Франция) и норванкомицина (Augsburg, Германия, степ. чистоты >95,0%).

Образцы «высушенной капли»

Все 15 образцов «высушенной капли» получали от новорожденных пациентов, которым проводили терапию ванкомицином на базе ГУЗ «Клинической больницы № 5» отдела неонатологии г. Волгограда (Россия). Образцы получали по стандартным протоколам [5].

Отбор проб осуществляли согласно следующему алгоритму:

1. Оформили информированное добровольное согласие законного представителя;
2. Подписали карту капли с идентификатором пациента и датой;
3. Выбрали место проведения пункции на боковой стороне пятки;
4. Подготовили стопу с помощью теплой пеленки;
5. Обработали руки и надели стерильные перчатки;
6. Расположили пятку ниже туловища ребенка и удерживали ее без резкого сгибания лодыжки;
7. За 5 мин до укола *per os* шприцом вводили 30% раствор глюкозы в дозе, указанной на рисунке 1 плюс к этому нутритивное сосание;
8. Обработывали место проведения пункции антисептическим раствором;
9. Повторно вводили пациенту *per os* шприцом 30% раствор глюкозы непосредственно перед уколом;
10. Быстро прокалывали кожу ланцетом и убирали стерильным ватным шариком первую каплю крови;
11. Сразу после укола снова вводили 30% раствор глюкозы *per os* плюс к этому нутритивное сосание;
12. Удерживали место пункции внизу, осторожно надавливая на прилегающую область и проводили взятие крови на бланк фильтровальной бумаги;
13. Держали карту, не касаясь отмеченной области;
14. Осторожно прикоснувшись карточкой фильтровальной бумаги к капле крови, наносили её на карту. Давали впитаться крови, пока круг не заполнялся полностью. После нанесения крови к отмеченной области не прикасались;
15. Давали пятну крови высохнуть в темном месте, без прямых солнечных лучей в течение не менее 4 ч. Во время процесса сушки не допускали нагрева и контакта образцов высушенной капли с другими поверхностями;
16. Запечатывали карту (или части карты) в газонепроницаемый пакет с застежкой–молнией. Хранили не более одной карты в упаковке в холодильнике до отправки в лабораторию при 2–8°C.

Оборудование

Разделение компонентов проводили с использованием ВЭЖХ системы Agilent 1260 (Agilent, США). Анализируемые вещества детектировали с помощью гибридной масс-спектрометрической системы Sciex QTRAP 5500 (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур). Для взвешивания сухих веществ

использовали полумикроаналитические весы Ohaus Explorer EX225/AD (Ohaus, США). В процессе работы также использовали центрифугу 5427 R (Eppendorf, США). Карту GE Whatman FTA WB129242 DMPK-B (США) применяли для архивирования сухих пятен крови. Во время работы системы полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Sciex Analyst 1.6.2.

Приготовление сток-раствора вещества и внутреннего стандарта

Для приготовления стандартных растворов ванкомицина и внутреннего стандарта с концентрацией 1,00 мг/мл взвешивали сухие навески (массой 25 мг) и далее помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки сверхчистой водой.

Приготовление раствора для экстракции образцов «высушенной капли крови»

Отдельно готовили экстрагирующий раствор, который представлял собой смесь воды и метанола в соотношении 1:1 с 0,1 % муравьиной кислотой.

Приготовление рабочих растворов стандартов

Для каждой аналитической серии готовили свежие рабочие растворы стандартов. Конечная концентрация рабочих растворов составила: 10, 20, 50, 100, 200, 500 и 1000 мкг/мл.

Приготовление калибровочных стандартов и образцов контроля качества в образцах «высушенной капли крови»

100 мкл цельной крови переносили в микропробирку на 1,5 мл и добавляли 10 мкл рабочего раствора соответствующей концентрации для получения калибровочных растворов с концентрацией 1, 2, 5, 10, 20, 50 и 100 мкг/мл для ванкомицина. Для образцов контроля качества (КК) 1 (нижний предел количественного определения – НПКО); 7,5 (низкий КК); 35 (средний КК); 75 (высокий КК) мкг/мл для ванкомицина. Далее 20 мкл рабочих растворов наносили на фильтровальную бумагу и сушили в течение 3-х ч.

Пробоподготовка анализируемых проб

Для подготовки образцов «высушенной капли крови» использовали диск диаметром 6 мм из карт, на который специальным устройством наносили образцы и который впоследствии анализировали.

Экстракция образцов «высушенной капли крови»

В пробирку с вырезанным диском добавляли 400 мкл экстракционного раствора. Пробирку центрифугировали при 1000 об/мин в течение 30 мин при 25°C. После 10 мин центрифугирования при 10.000 g аликвоту 350 мкл надосадочной жидкости выпаривали при 45°C 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 ВЭЖХ-МС/МС.

Хроматографические и масс-спектрометрические условия

Таким образом, на основе имеющихся в литературе данных и собственных исследований, нами был разработан и валидирован биоаналитический метод анализа ванкомицина в плазме крови человека с применением ВЭЖХ-МС/МС системы, удовлетворяющий требованиям протокола исследования и валидированный в соответствии с руководством FDA для предприятий «Bioanalytical Method Validation» и руководством EMEA «Guideline on Bioanalytical Method Validation».

При разработке условий масс-спектрометрической детекции искомых веществ использовали ионы-предшественники (725,3 m/z) и соответствующие им ионы-продукты (88,1 и 387,9 m/z).

Статистическая обработка

Валидацию биоаналитической методики проводили в соответствии с «Руководством по экспертизе лекарственных средств», а также с руководствами U.S. Food and Drug Administration и EMA (European Medicines Agency) по следующим показателям: стабильность, селективность, линейность, правильность, прецизионность, НПКО. Экспериментально рассчитанные концентрации градуировочных стандартов должны лежать в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений (за исключением НПКО, для которых эти значения могут находиться в пределах $\pm 20\%$). А также по специфическим показателям, таким как эффект объема капли, эффект гематокрита, однородность капли по уже разработанным протоколам [8–10]. Обработку полученных данных проводили с использованием программно-статистической среды R 3.6.1 в программе RStudio 1.2, а также специализированного программного обеспечения Sciex Analyst 1.6.2.

При валидации однородности капли сравнивали результаты 2-х уровней концентраций образцов КК на трех различных уровнях гематокрита, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и у края. Анализ проводили в 5 повторностях. При этом относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не должна была превышать 15%.

Для оценки влияния эффекта объема капли необходимо было провести анализ 3-х разных объемов (10, 40, 70 мкл) при среднем уровне гематокрита (0,4), на 2-х уровнях концентрации в 5 повторностях. При этом относительная погрешность не должна была превышать 15%.

Оценивали также эффект гематокрита на 3-х уровнях (0,3; 0,4; 0,5), при 2 концентрационных

уровнях в 5 повторностях. Относительная погрешность рассчитанных концентраций не должна была превышать 15% от полученных значений при среднем уровне гематокрита.

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 методом Бланда-Алмана. Данный метод позволяет провести сравнение результатов измерений, выполненных двумя разными способами. Его 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 отражает степень разброса результатов.

Средние значения и стандартные отклонения рассчитывали с помощью программы Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США), статистическую обработку результатов исследования проводили в программе GraphPad Prism 6 (США).

Среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD) 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 «высушенной капли крови» для анализа образцов пациентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка метода количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ванкомицина включала определение оптимальных параметров хроматографического разделения, а также последующей масс-спектрометрической детекции.

Используя ранее накопленный опыт, были подобраны оптимальные условия хроматографического разделения, которое проводили на колонке Poroshell 120 C18 (4,6×50 мм, 2,7 мкм). Мобильная фаза представляла собой смесь ацетонитрила и воды 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. В ходе оптимизации условий хроматографического разделения был выбран изократический режим элюирования [5, 8, 11, 12].

Время удерживания ванкомицина составило 1,63 мин (Рис. 1) при изократическом режиме элюирования.

В качестве метода ионизации использовали электроспрей (ESI). Детекцию ионов проводили в режиме положительной полярности.

При разработке условий масс-спектрометрической детекции искомых веществ использовали ионы-предшественники (725,3 m/z) и соответствующие им ионы-продукты (88,1 и 387,9 m/z).

Разработанная методика подтвердила свою линейность в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкг/мл (K1 – 1 мкг/мл, K2 – 3 мкг/мл, K3 – 5 мкг/мл, K4 – 10 мкг/мл, K5 – 25 мкг/мл, K6 – 50 мкг/мл, K7 – 80 мкг/мл, K8 – 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.

НПКО методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности приведенных в таблице 1. Селективность валидировали путем анализа 6 холостых образцов и 6 образцов НПКО. Площадь пиков в области времени удерживания аналита не превышала 20% от НПКО (Табл. 1).

Также для метода «высушенной капли крови» было оценено влияние гематокрита, объема капли и её однородности.

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. 2).

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

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

Термическую стабильность оценивали при хранении образцов «высушенной капли крови» в течение 14 сут при температуре 22 и 45°C, как потенциально возможные температуры при хранении и транспортировке образцов. Для оценки стабильности использовали образцы «высушенной капли крови» на уровнях QCL и QCN. При этом образцы анализировали в 3-х временных точках – 1, 7 и 14 сут вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивали со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов КК. После 14 дней хранения рассчитанные концентрации образцов находились в диапазоне от 85,4–87,5%.

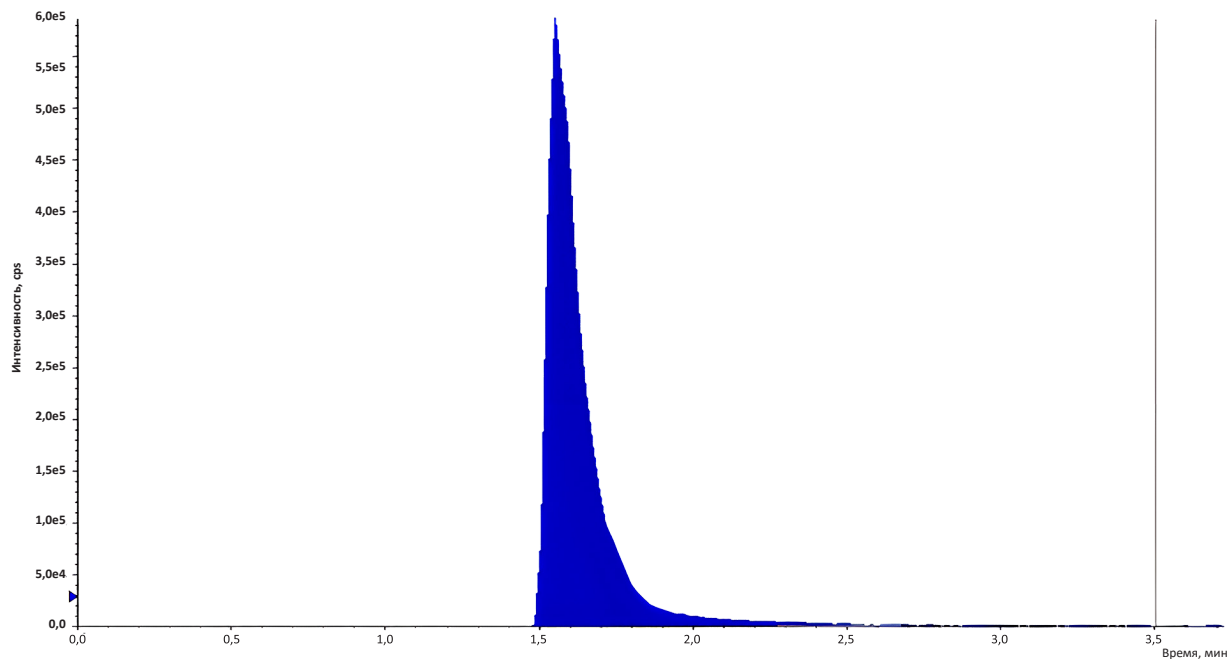


Рисунок 1 – Хромато-масс-спектр ванкомицина в образцах «высушенной капли крови»

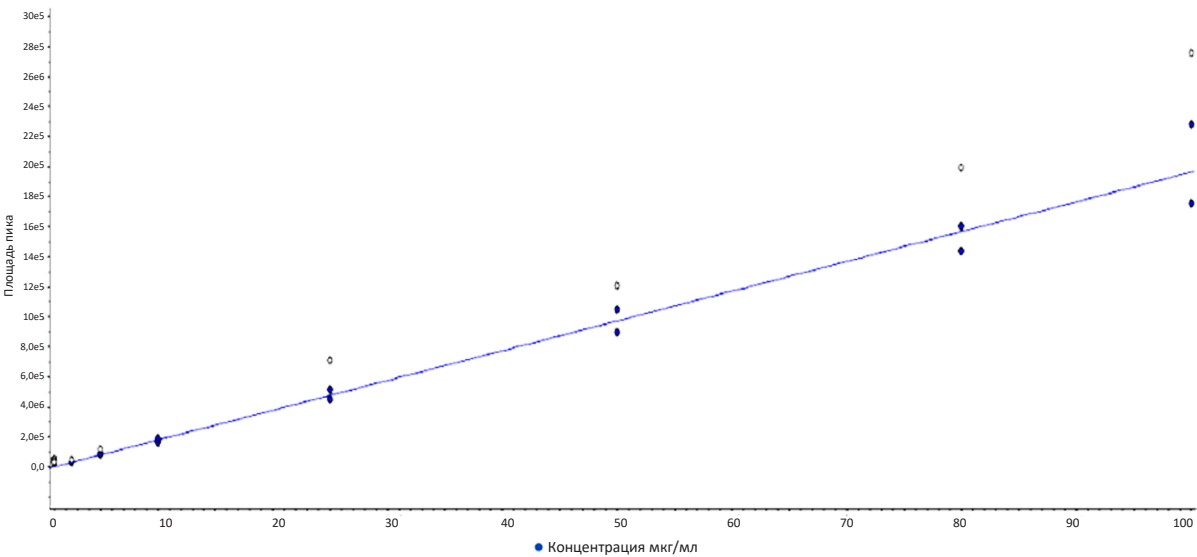


Рисунок 2 – Калибровочная кривая ванкомицина в плазме крови

Таблица 1 – Рассчитанные валидационные характеристики для метода с использованием в качестве пробоподготовки «высушенную каплю крови»

Параметр		Значение			
		НПКО (1 мкг/мл)	Нижний КК (7,5 мкг/мл)	Средний КК (35 мкг/мл)	Верхний КК (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			

Примечание: КК – контроль качества.

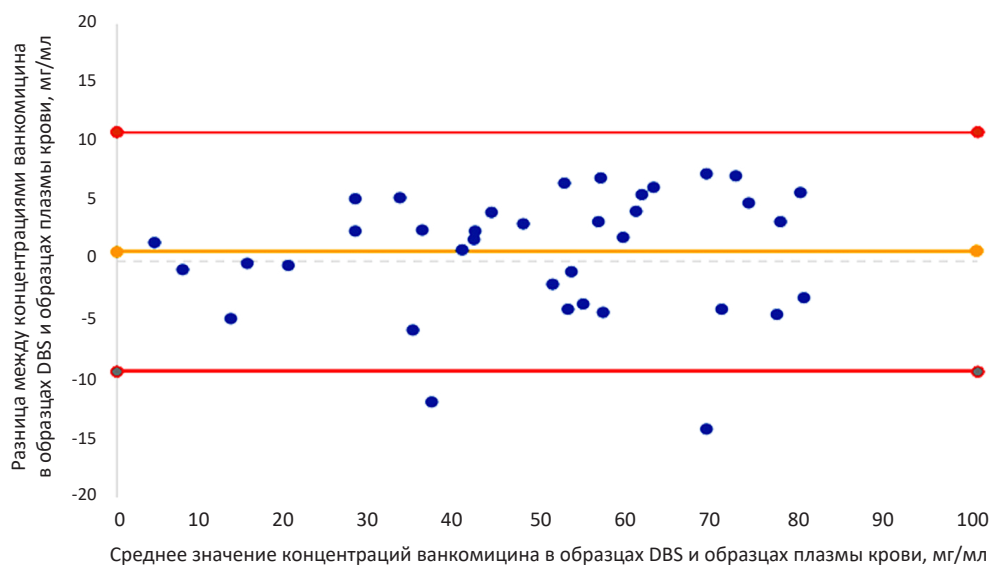


Рисунок 3 – Сравнение двух методов пробоподготовки по Блэнду-Алтману для ванкомицина

Примечание: DBS – высушенная капля крови.

Таблица 2 – 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

Таблица 3 – Влияние объема капли на результаты анализа

Объем капли, мкл	QC	Номинальная концентрация, мг/мл	Точность, %
10	LQC	7,5	105,7
	HQC	75	108,9
40	LQC	7,5	96,4
	HQC	75	104,5
70	LQC	7,5	91,5
	HQC	75	96,4

Таблица 4 – Влияние места выреза на результаты анализа

Место выреза	QC	Номинальная концентрация, мг/мл	Точность, %
Центральный вырез	LQC	7,5	98,3
	HQC	75	103,7
Краевой вырез	LQC	7,5	93,3
	HQC	75	96,5

Для сравнительного исследования использовали образцы «высушенной капли крови», которые получали от новорожденных, находящихся на терапии ванкомицином в ГУЗ «Клинической больницы № 5» (Волгоград, Россия). Сравнивали значения концентраций ванкомицина в образцах «высушенной капли крови» и образцах плазмы (Рис. 3).

М и SD разницы между двумя совпадающими показаниями рассчитывали для определения эквивалентности двух методов. Результаты исследования показали, что более 95% рассчитанных средних концентраций находятся в пределах $d-2s$ и $d+2s$, которые соответствовали значениям $-10,2$ и $12,2$, что подтверждает пригодность разработанного метода для анализа.

ОБСУЖДЕНИЕ

ТЛМ представляет собой алгоритмы измерения количества конкретных лекарств через определенные промежутки времени для поддержания постоянной концентрации в кровотоке пациента с целью оптимизации и индивидуализации схем дозирования. Данный подход применяют для мониторинга лекарств с узким терапевтическим диапазоном, выраженной ФК вариабельностью, или для тех, целевые концентрации которых трудно контролировать. Для лекарственных средств с четкой зависимостью «доза-эффект» ТЛМ может существенно повысить эффективность и безопасность лечения, снизить затраты в социально-медицинской сфере.

В настоящее время ТЛМ у новорожденных не относят к рутинной практике. Крупные клинические центры, которые имеют возможности для его проведения, для оценки целевой экспозиции, чаще всего ограничиваются определением C_{trough} ванкомицина [4].

Общепризнанной целью проведения ТЛМ ванкомицина является оценка системной экспозиции по определению C_{trough} , как остаточной концентрации перед введением следующей дозы препарата. Согласно международным рекомендациям, целевая C_{trough} ванкомицина должна находиться на уровне $10-20$ мг/л и быть выше минимально ингибирующая концентрация (МИК) [1]. Рекомендованный диапазон C_{trough} позволяет достигать необходимых ФД показателей – ПФК24 / МИК [4].

Однако основной проблемой, которая стоит перед врачами, является необходимость оценки возможности и точности экстраполяции целевых ФК и ФД показателей ($C_{trough}=10-20$ мг/л и ПФК24 / МИК >400) [1].

Согласно международным рекомендациям, целевой уровень C_{trough} в настоящее время составляет $15-20$ мг/л и отношения ПФК24 / МИК >400 . Ряд исследований в отдельных популяциях, указывает на высокую вариабельность параметров ФК, при этом целевые значения C_{trough} $15-20$ мг/л и отношения ПФК2 / МИК >400 в них не достигали в среднем $30-33\%$ исследуемой популяции [13, 14].

На сегодняшний день ТЛМ ванкомицина предполагает дополнительно к измерению равновесной остаточной концентраций (C_{trough}) расчет площади под ФК кривой за 24 ч (ПФК24), с последующей оценкой целевого соотношения ФК / ФД, которое выражается как отношение ПФК24 к минимальной ингибирующей концентрации (МИК) ПФК24 / МИК >400 [13, 15, 16]

Новорожденные и пациенты детского возраста чувствительны не только к тем или иным ксенобиотикам, но и подвержены различным рискам вирусных, бактериальных или грибковых инвазий, многие из которых значительно изменяют функционирование систем метаболизма и выведения. Неонатальный возраст может являться фактором риска развития нефротоксичности, значимость которого увеличивается пропорционально недоношенности.

В проведенных ранее исследованиях, с применением математического моделирования и ТЛМ у пациентов с нарушением функции почек и с инфекционными осложнениями было доказано, что их наличие значительно влияет на ФК параметры. Так было продемонстрировано, что при стандартном подходе к дозированию в 65% случаев не удаётся достичь целевых значений для C_{trough} $15-20$ мкг/мл через 48 ч от начала терапии. Это свидетельствует о высокой вариабельности параметров ФК ванкомицина, особенно в группе пациентов с нарушениями функции почек [17].

В исследовании Kim J. И соавт. было показано, что у новорожденных с адекватной функцией почек при режиме дозирования от 9 до 12 мг/кг внутривенно каждые 8 ч вероятность достижения целевых концентраций ванкомицина низкая [18].

Для оценки всех этих параметров и оптимизации ТЛМ существуют различные математические модели, которые позволяют предусмотреть неизвестные ФК параметры. Известны как простые однокомпарментные модели – «медицинские калькуляторы», так и более сложные – «калькуляторы доз», применение которых позволяет корректировать режим дозирования для достижения C_{trough} в диапазоне $15-20$ мкг/мл [1, 19].

Стоит выделить, что международные рекомендации по режиму дозирования ванкомицина не всегда оптимальны. Так у недоношенных пациентов данные рекомендации являются недостаточными для получения минимальных концентраций в сыворотке от 10 до 20 мкг/мл [20].

Исследование ФК / ФД для уже используемых в клинической практике антибиотиков необходимы для оптимизации режимов дозирования, в том числе для предупреждения развития резистентности. Поскольку результаты исследований, которые проводятся на взрослых, часто неприменимы для новорожденных локальный ТЛМ представляет не только полезный инструмент оптимизации терапии, но и ценный источник данных, которые могут иметь не только прикладное значение, но и носить фундаментальный характер. Отдельными

вопросами, которые необходимо решить, являются методы отбора биообразцов и оптимизация их количества, что связано с возрастом и размерами пациентов [21].

Большинство рекомендаций разработаны для взрослых пациентов [1, 3, 4, 11]. Что касается новорожденных детей, то стандартизации процесса мешают меньшее количество исследований, а значит и значительно меньшее количество данных для анализа, вариабельность ФК показателей, более сложное моделирование с необходимостью учёта большего количества ковариат [4].

Для современной разработки руководств, инструкций и протоколов требуются дополнительное проведение ФК исследований, построение математических моделей и внедрение алгоритмов ТЛМ. Что и вызывает трудности, так как исследования и ТЛМ помимо финансирования и прохождения большого количества бюрократических процедур требуют решения многих задач технического характера. [6] Так, например, не решен вопрос с определением оптимального количества биообразцов; кровь, из которой впоследствии получают плазму или сыворотку отбирают из вены, но ее количество и техническая сложность проведения значительно осложняют процесс разработки нормативной документации. ТЛМ антибиотиков у новорожденных и недоношенных детей практикуют редко именно из-за сложностей с отбором крови. [1]

Обозначенное выше указывает на необходимость разработки эффективных и менее инвазивных методов получения биообразцов от новорожденных и пациентов детского возраста. Одним из них является метод «высушенной капли крови» (Dried Blood Spot, DBS), который является наиболее удобным способом получения биоматериала по сравнению со стандартными [6]. Полученные биообразцы с помощью данного метода обладают большей стабильностью, их удобнее транспортировать и хранить [4, 22]. Данные преимущества не только раскрывают целесообразность использования метода «высушенной капли крови» для проведения ТЛМ в случаях с новорожденными или пациентами детского возраста, но и определяют необходимость проведения исследований в данном направлении, например при использовании ванкомицина при лечении заболеваний у новорожденных и пациентов детского возраста [1].

Получение биообразцов для проведения пробоподготовки и анализа методом «высушенной капли крови» требует дополнительной оптимизации. Используемые в настоящее время валидационные протоколы биоаналитических методик, которые описаны в руководствах для традиционных образцов, не учитывают всех необходимых аспектов новой технологии «высушенной капли» и усложняют последующее применение метода в ТЛМ. На результаты анализа могут влиять специфические характеристики, такие как гематокрит, гомогенность капли и её размер, что требует определения новых подходов к разработке и валидации методов качественного и количественного определения [4, 23].

Информативность и прогностическая ценность ТЛМ при проведении обоснованной, с точки зрения фармакокинетики, индивидуализации при подборе режима дозирования определяются надежностью используемых аналитических методов, применяемых для количественного определения лекарственных препаратов в биологических образцах [24]. Для данных целей необходимо использовать селективные и высокочувствительные аналитические методы, таких как ВЭЖХ–МС/МС [25, 26].

ФК исследования и ТЛМ требуют большого количества биообразцов, что сложно осуществить при работе с новорожденными [27]. Вследствие этого возникает необходимость применения менее инвазивных способов пробоподготовки для последующего внедрения их в алгоритмы ТЛМ. Одним из перспективных подходов осуществления подобного мониторинга у новорожденных может стать метод «высушенной капли крови». Необходимым направлением, без которого внедрение новых методов мониторинга и оптимизации фармакотерапии у новорожденных будет затруднительно, является разработка высокоселективных и специфичных методов качественного и количественного определения ванкомицина с использованием метода «высушенной капли крови» [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одними из важных результатов данного исследования стало определение оптимальных условий количественного анализа с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрической детекции определения ванкомицина в образцах «высушенной капли крови». В результате исследования удалось провести валидацию методики определения ванкомицина в образцах «высушенной капли крови». Доказана тождественность результатов количественного определения ванкомицина при стандартных и предлагаемых вариантах пробоподготовки.

Обозначенное выше позволяет рекомендовать метод «высушенной капли крови» для проведения ТЛМ ванкомицина и дополнительных исследований фармакокинетики у данной группы пациентов, что позволит провести оптимизацию и приблизить проводимую фармакотерапию новорожденных к идеалам персонализированной медицины. Разработка подобных методов позволяет решить важную практическую задачу в области исследования фармакокинетики новорожденных, что немаловажно для клинической фармакологии поскольку проведение клинических исследований у маленьких пациентов осложнено в том числе этими причинами. Разработка методов качественного и количественного определения различных веществ в крови, располагая биообразцами минимального размера, существенно расширит возможности проведения клинических исследований, что безусловно поспособствует развитию не только общей и клинической фармакологии, но и существенно усилит фармакотерапию.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках Гранта РФФИ по теме: «Разработка популяционной фармакоэкономической модели для оценки прогностической значимости факторов вариабельности параметров фармакокинетики антибактериальных препаратов у новорождённых», в рамках соглашения от 10 июня 2022 года № 11 (на проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований) между Комитетом экономической политики и развития Волгоградской области, Российским научным фондом и федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также руководителем научного коллектива.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ВКЛАД АВТОРОВ

И.С. Аникеев, Т. Е. Заячникова, Ю.С. Казьмина – концепция, планирование статьи, обзор литературных источников, сбор материалов, написание и редактирование статьи; В.И. Петров, А.В. Стрыгин, Д.В. Куркин – разработка дизайна исследования, редактирование и окончательное утверждение статьи. Все авторы сделали эквивалентный и равнозначный вклад в подготовку публикации. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Толкачев Б.Е., Петров В.И., Заячникова Т.Е., Стрыгин А.В., Аникеев И.С., Доценко А.М. Терапевтический лекарственный мониторинг ванкомицина у новорожденных: проблемы и перспективы // Лечебное дело. – 2021. – № 2. – С. 17–24. DOI: 10.24412/2071-5315-2021-12327
2. Pham J.T. Challenges of vancomycin dosing and therapeutic monitoring in neonates // J Pediatr Pharmacol Ther. – 2020. – Vol. 25, No. 6. – P. 476–484. DOI: 10.5863/1551-6776-25.6.476
3. Туфанова О.С., Касимова А.Р., Божкова С.А. Оценка эффективности и безопасности фармакотерапии ванкомицином у пациентов с ортопедической инфекцией с помощью методики терапевтического лекарственного мониторинга // Безопасность и риск фармакотерапии. – 2022. – Т. 10, № 2. – С. 128–138. DOI: 10.30895/2312-7821-2022-10-2-128-138
4. Rybak M.J., Lomaestro B.M., Rotschafer J.C., Moellering R.C. Jr., Craig W.A., Billeter M., Dalovisio J.R., Levine D.P. Therapeutic monitoring of vancomycin in adults summary of consensus recommendations from the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists // Pharmacotherapy. – 2009. – Vol. 29, No. 11. – P. 1275–1279. DOI: 10.1592/phco.29.11.1275
5. Петров В.И., Аникеев И.С., Заячникова Т.Е., Стрыгин А.В., Доценко А.М. Адаптация метода «высушенной капли крови» для проведения терапевтического лекарственного мониторинга // Фармация и фармакология. – 2022. – Т. 10, № 4. – С. 331–342. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-331-342
6. Толкачев Б.Е., Стрыгин А.В., Аникеев И.С. Терапевтический лекарственный мониторинг с использованием метода «высушенной капли»: проблемы и перспективы // Лекарственный вестник. – 2021. – Т. 15, № 3 (83). – С. 13–20.
7. Аникеев И.С., Осадченко Н.А., Басаргина П.С., Жуковская Ю.А., Милеева Ю.С. Разработка высокочувствительного хромато-масс-спектрометрического метода определения ванкомицина и пиперациллина в плазме крови // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Материалы 76-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2018. – С. 522.
8. Петров В.И., Аникеев И.С., Заячникова Т.Е., Стрыгин А.В., Доценко А.М., Стрыгина А.О. Разработка и валидация количественного ВЭЖХ-МС/МС метода определения ванкомицина в плазме крови // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2022. – Т. 19, № 4. – С. 128–134. DOI: 10.19163/1994-9480-2022-19-4-128-134
9. Li Y., Yin L., Li Y., Sun Z., Zhao X., Gao M., Wang H. Therapeutic drug monitoring of vancomycin and voriconazole by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method // Chemical Research in Chinese Universities. – 2017. – Vol. 33. – P. 339–342. DOI: 10.1007/s40242-017-7051-8
10. Usman M., Hempel G. Development and validation of an HPLC method for the determination of vancomycin in human plasma and its comparison with an immunoassay (PETINIA) // Springerplus. – 2016. – Vol. 5. – Art. ID: 124. DOI: 10.1186/s40064-016-1778-4
11. Matsumoto K., Takesue Y., Ohmagari N., Mochizuki T., Mikamo H., Seki M., Takakura S., Tokimatsu I., Takahashi Y., Kasahara K., Okada K., Igarashi M., Kobayashi M., Hamada Y., Kimura M., Nishi Y., Tanigawara Y., Kimura T. 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 // J Infect Chemother. – 2013. – Vol. 19, No. 3. – P. 365–380. DOI: 10.1007/s10156-013-0599-4
12. Schmitt V., Szeitz A., Klassen T.L., Häfeli U.O. An ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of vancomycin requiring only 2 µl of rabbit serum // Am J Anal Chem. – 2017. – Vol. 09 (08). – P. 553–563. DOI: 10.4236/ajac.2017.89040
13. Bel Kamel A., Bourguignon L., Marcos M., Ducher M., Goutelle S. Is trough concentration of vancomycin predictive of the area under the curve? A clinical study in elderly patients // Ther Drug Monit. 2017. – Vol. 39, No. 1. – P. 83–87. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000359
14. Reilly A.M., Ding M.X., Rower J.E., Kiser T.H. The effectiveness of a vancomycin dosing guideline in the neonatal intensive care unit for achieving goal therapeutic trough concentrations // J Clin Pharmacol. – 2019. – Vol. 59, No. 7. – P. 997–1005. DOI: 10.1002/jcph.1392
15. Moise-Broder P.A., Forrest A., Birmingham M.C.,

- Schentag J.J. Pharmacodynamics of vancomycin and other antimicrobials in patients with *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections // *Clin Pharmacokinet.* – 2004. – Vol. 43, No. 13. – P. 925–942. DOI: 10.2165/00003088-200443130-00005
16. Плотников Г.П., Кудрявцев А.Н., Клеузович А.А., Чижов А.Г., Пономарев А.А., Ларин С.С., Литвин Е.А., Анастасевич Л.А. Терапевтический лекарственный мониторинг антибиотиков: практическое значение в терапии сепсиса // *Вестник анестезиологии и реаниматологии.* – 2022. – Т. 19, № 6. – С. 62–71. DOI: 10.21292/2078-5658-2022-19-6-62-71
17. Jacqz-Aigrain E., Leroux S., Thomson A.H., Allegaert K., Capparelli E.V., Biran V., Simon N., Meibohm B., Lo YL., Marques R., Peris J.E., Lutsar I., Saito J., Nakamura H., van den Anker J.N., Sharland M., Zhao W. Population pharmacokinetic meta-analysis of individual data to design the first randomized efficacy trial of vancomycin in neonates and young infants // *J Antimicrob Chemother.* – 2019. – Vol. 74, No. 8. – P. 2128–2138. DOI: 10.1093/jac/dkz158
18. Kim J., Walker S.A., Iaboni D.C., Walker S.E., Elligsen M., Dunn M.S., Allen V.G., Simor A. Determination of vancomycin pharmacokinetics in neonates to develop practical initial dosing recommendations // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58, No. 5. – P. 2830–2840. DOI: 10.1128/AAC.01718-13
19. Абаимов Д.А., Сариев А.К., Носкова Т.Ю., Шведков В.В., Ширяева М.В., Стырова Е.Ю., Прохоров Д.И., Сейфулла Р.Д. Современные технологии в терапевтическом лекарственном мониторинге // *Эпилепсия и пароксизмальные состояния.* – 2013. – Т. 5, № 2. – С. 31–41.
20. Ringenberg T., Robinson C., Meyers R., Degnan L., Shah P., Siu A., Sturgill M. Achievement of therapeutic vancomycin trough serum concentrations with empiric dosing in neonatal intensive care unit patients // *Pediatr Infect Dis J.* – 2015. – Vol. 34, No. 7. – P. 742–747. DOI: 10.1097/INF.0000000000000664
21. Verhoven S.M., Groszek J.J., Fissell W.H., Seegmiller A., Colby J., Patel P., Verstraete A., Shotwell M. Therapeutic drug monitoring of piperacillin and tazobactam by RP-HPLC of residual blood specimens // *Clin Chim Acta.* – 2018. – Vol. 482. – P. 60–64. DOI: 10.1016/j.cca.2018.03.021
22. Westra N., Proost J.H., Franssen C.F.M., Wilms E.B., van Buren M., Touw D.J. Vancomycin pharmacokinetic model development in patients on intermittent online hemodiafiltration // *PLoS One.* – 2019. – Vol. 14, No. 5. – P. e0216801. DOI: 10.1371/journal.pone.0216801
23. Al-Ghazawi M., El Huda Daoud N., Hadidi K.A., Alzweiri M., Aburuz S. Determination of vancomycin content in dried blood spots for therapeutic drug monitoring // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research.* – 2021. – Vol. 78, No. 1. – P. 3–10. DOI: 10.32383/APPDR/132021
24. Wilhelm A.J., den Burger J.C., Swart E.L. Therapeutic drug monitoring by dried blood spot: progress to date and future directions // *Clin Pharmacokinet.* – 2014. – Vol. 53, No. 11. – P. 961–973. DOI: 10.1007/s40262-014-0177-7
25. Liu M., Yang ZH., Li G.H. 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 // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23, No. 11. – P. 2939. DOI: 10.3390/molecules23112939
26. Муратов К.М., Морозова Т.Е. Сравнение показателей фармакокинетики ванкомицина, полученных на основании терапевтического лекарственного мониторинга и методом математического моделирования // *Фармакогенетика и фармакогеномика.* – 2018. – № 2. – С. 27–27. DOI: 10.24411/2588-0527-2018-10011
27. Rybak M.J., Le J., Lodise T.P., Levine D.P., Bradley J.S., Liu C., Mueller B.A., Pai M.P., Wong-Beringer A., Rotschafer J.C., Rodvold K.A., Maples H.D., Lomaestro B.M. Executive summary: therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a revised consensus guideline and review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists // *Pharmacotherapy.* – 2020. – Vol. 40, No. 4. – P. 363–367. DOI: 10.1002/phar.2376
28. Kang J.S., Lee M.H. Overview of therapeutic drug monitoring // *Korean J Intern Med.* – 2009. – Vol. 24, No. 1. – P. 1–10. DOI: 10.3904/kjim.2009.24.1.1

АВТОРЫ

Петров Владимир Иванович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; главный внештатный специалист – клинический фармаколог Министерства здравоохранения РФ, заслуженный деятель науки РФ, заслуженный врач РФ. ORCID ID: 0000-0002-0258-4092. E-mail: brain@sprintnet.ru

Аникеев Иван Сергеевич – ассистент кафедры фундаментальной медицины и биологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; заведующий лабораторией фармакокинетики НЦИЛС ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-9384-4338. E-mail: anikeivan@yandex.ru

Заячникова Татьяна Евгеньевна – кандидат медицинских наук, доцент, профессор кафедры педиатрии и неонатологии Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования

ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-6758-4686. E-mail: guz5deti@mail.ru

Стрыгин Андрей Валерьевич – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фундаментальной медицины и биологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; заместитель директора НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-6997-1601. E-mail: drumsav@mail.ru

Куркин Денис Владимирович – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; старший научный сотрудник лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых систем НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-1116-3425. E-mail: strannik986@mail.ru

Казьмина Юлия Сергеевна – ассистент кафедры фундаментальной медицины и биологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-3324-3351. E-mail: ev8278@mail.ru