

БЕЗВУЛЯК

Екатерина Игоревна

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА
ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ СЕРДЦА**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ
Вавилова Татьяна Владимировна

Официальные оппоненты:

Ройтман Александр Польевич – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии, профессор;

Великанова Людмила Иосифовна – доктор биологических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, научно-исследовательская лаборатория хроматографии, заведующая.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.И. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «18» июня 2024 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета 04.1.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д.4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д.54 и на сайте: <https://nrcerm.ru>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук, доцент

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) – междисциплинарное направление, находящееся на стыке лабораторной медицины, фармакологии и клинических дисциплин, являющееся мощным инструментом персонализированной медицины, суть которого состоит в определении концентрации лекарственного вещества и / или его метаболитов в биологических жидкостях и коррективке дозы или кратности приема препарата на основании полученных данных [Родина Т.А. и соавт., 2019].

Одной из групп препаратов, требующих ТЛМ, являются иммуносупрессоры, которые с одной стороны обладают узким терапевтическим интервалом и тяжелыми побочными эффектами, а с другой – определяют прогноз для здоровья и жизни пациентов и в обязательном порядке используются после пересадки органов. Особое значение ТЛМ имеет в персонализированной терапии пациентов, перенесших пересадку сердца.

Трансплантация сердца является высокотехнологичным методом лечения терминальной сердечной недостаточности и признанным «золотым стандартом» оказания помощи пациентам, риск смерти которых в течение года составляет более 50% при невозможности использования других методов лечения [Готье С.В., 2019; Федотов П.А. и соавт., 2022]. Количество проводимых трансплантаций сердца в мире составляет около 6000 операций в год. Результаты эпидемиологических исследований ЭПОХА-ХСН и ЭПОХА-О-ХСН, проведенных в Российской Федерации, продемонстрировали, что расчетная выборка пациентов с ХСН любого функционального класса в РФ может достигать 12 млн. чел., при этом общее число пациентов с ХСН III-IV ФК в РФ на 2017 г. составило 4,5 млн. и продолжает увеличиваться [Поляков Д.С. и соавт., 2021]. Количество пациентов в России, находящихся в листе ожидания трансплантации сердца, увеличилось за последние 10 лет в 2 раза и составило в 2019 г. 789 потенциальных реципиентов [Готье С.В. и соавт., 2020].

С учетом научных достижений в вопросах трансплантации сердца медиана выживаемости пациентов составляет на сегодняшний день 14 лет [Головкин А.С. с соавт., 2022]. Одним из лимитирующих факторов, определяющих прогноз у пациентов после пересадки сердца, выступает возникновение отторжения трансплантированного органа [Трансплантация сердца, наличие трансплантированного сердца, отмирание и отторжение трансплантата сердца, 2023; Головкин А.С. с соавт., 2022; Веревкин А.А., 2021; Колоскова Н.Н. и соавт., 2018; Тхатль Л.К. и соавт., 2017]. По данным литературы, отторжение трансплантированного сердца является одной из лидирующих причин смерти пациентов в первые три года после пересадки сердца [Ставенчук Т.В. и соавт., 2017]. Риск отторжения сердечного трансплантата максимален в первые месяцы после пересадки и постепенно снижается, сохраняясь при этом в течение всей жизни реципиента [Трансплантация сердца, наличие трансплантированного сердца, отмирание и отторжение трансплантата сердца,

2023], что обуславливает необходимость пожизненной иммуносупрессивной терапии [Колоскова Н.Н. и соавт., 2018].

Иммуносупрессивная терапия, которую получают пациенты с трансплантированным сердцем, состоит из индукционной терапии, проводимой в периоперационном и раннем послеоперационном периоде препаратами с выраженным иммуносупрессивным эффектом с целью профилактики острого и сверхострого отторжения, и поддерживающей терапии. Поддерживающая терапия представляет собой комбинацию иммуносупрессантов с разными механизмами действия (глюкокортикостероиды, ингибиторы кальциневрина, препараты микофенолата мофетила, ингибиторы пролиферативного сигнала mTOR) [Трансплантация сердца, наличие трансплантированного сердца, отмирание и отторжение трансплантата сердца, 2023; Колоскова Н.Н., 2020]. Все группы препаратов обладают индивидуальными фармакокинетическими и фармакодинамическими особенностями, эффективностью, побочными эффектами.

Одним из лекарственных средств, рекомендованных к применению у пациентов после трансплантации сердца с целью профилактики отторжения трансплантата, является ингибитор пролиферативного сигнала эверолимус [Трансплантация сердца, наличие трансплантированного сердца, отмирание и отторжение трансплантата сердца, 2023]. Существует ряд эффектов эверолимуса, которые делают его препаратом выбора при проведении иммуносупрессивной терапии: прямое благоприятное воздействие на ремоделирование сосудистого русла, что снижает риски васкулопатии трансплантата, антионкогенный эффект, хороший прогноз в отношении цитомегаловирусной инфекции и сохранения почечной функции по сравнению с другими препаратами [Ульянкина И.В. и соавт., 2017; Tan L. et al., 2019; Holdaas H. et al., 2016; Choi H. et al., 2019].

Эверолимус характеризуется узким терапевтическим интервалом и выраженной межиндивидуальной вариабельностью фармакокинетических параметров, что требует проведения ТЛМ во время терапии с целью достижения эффективности препарата и профилактики токсических проявлений (кашель, гипертриглицеридемия, гиперхолистеринемия, стоматит, одышка, диарея, слабость, артериальная гипертензия, осложнения заживления ран, интерстициальный пневмонит, гематологические заболевания, периферические отеки) [Shipkova M. et al., 2016; Verstraete A.G. et al., 2018; Лекарственный мониторинг и взаимозаменяемость оригинальных и генерических иммунодепрессантов с узким терапевтическим индексом, 2014].

Для количественного определения эверолимуса в крови лабораторная медицина предлагает два метода исследования: иммунохимический метод и высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [Verstraete A.G. et al., 2018; Shipkova M. et al., 2019; Brozmanova H., 2020].

Иммунохимический метод привлекателен простотой использования, относительно низкими первичными капиталовложениями, а также не требует

подготовки высококвалифицированных сотрудников. Однако, данный метод является «непрямым» лабораторным методом, т. к. принцип его основан на взаимодействии «антиген-антитело», а не на измерении собственно концентрации лекарства [Максимова Н.Е. и соавт., 2021; Жердев А.В. и соавт., 2022]. Такая природа метода обуславливает получение положительного сигнала при наличии в смеси похожих на искомый аналит молекул [Brozmanova H., 2020; Shipkova M. et al., 2019].

ВЭЖХ-МС/МС является высокотехнологичным аналитическим методом ТЛМ, принцип которого заключается в многоэтапном определении необходимой молекулы вещества, что исключает главный недостаток иммунохимии – кросс-реактивность метаболитов [Черноносков А.А., 2023; Илларионова, Е.А. и соавт., 2018]. Надо отметить, ВЭЖХ-МС/МС требует больших стартовых капиталовложений, однако позволяет исследовать широкий спектр веществ (до 95% существующих лекарственных средств), в то время как для иммунохимии создана ограниченная панель тест-систем [Окунская Е.А. и соавт., 2020]. Кроме того, единичное исследование при помощи ВЭЖХ-МС/МС значительно дешевле использования дорогостоящих тест-систем для иммунохимического анализатора.

Существует проблема несопоставимости результатов между двумя методами [Schniedewind B. et al., 2020; Van Gelder T. et al., 2017; Ward G., et al., 2017; Hoffer E. et al., 2015], однако вопрос выбора метода для проведения ТЛМ эверолимуса у пациентов, перенесших трансплантацию сердца, на сегодняшний день не решен, сравнительные исследования, в том числе в проспективном наблюдении не проводились.

Степень разработанности темы исследования

Проблеме оптимизации иммуносупрессивной терапии эверолимусом у пациентов после трансплантации органов посвящены труды многих авторов [Tedesco-Silva H. et al., 2022; Gustafsson F. et al., 2020; Choi H. et al., 2019; Van Gelder T. et al., 2017; Shipkova M. et al., 2016]. Их работы в значительной мере содержат подробное объяснение механизма действия эверолимуса [Walter S. et al., 1997; Kirchner G.I. et al., 2004; Sanchez-Fructuoso A.I., 2008] и обоснование применения препарата у пациентов после трансплантации печени и почек [Tedesco-Silva H. et al., 2022; Kadry Z. et al., 2021; Pascual J. et al., 2017]. Кроме того, рассматриваются важные особенности терапии эверолимусом, а именно необходимость тщательного и индивидуального подбора дозы [Van Gelder T. et al., 2017], демонстрируются наиболее часто встречающиеся побочные эффекты эверолимуса [Arena C. et al., 2021], отражается зависимость токсических проявлений и эффективности терапии от дозы и концентрации, демонстрируются факторы, влияющие на достижение целевых концентраций [Aronson J.K., 2016; Van Gelder T. et al., 2017; Arena C. et al., 2021], обосновывается необходимость проведения терапевтического лекарственного мониторинга препарата в крови, рекомендуется целевой терапевтический интервал концентраций (3-8 нг/мл) [Shipkova M. et al., 2016; Van Gelder T. et al., 2017; Strobbe G. et al., 2020].

Терапевтический лекарственный мониторинг, как таковой, рассматриваются в ряде научных работ [Udomkarnjananum S. et al., 2021; Родина Т.А. и соавт., 2019; Shipkova M. et al., 2019; Oellerich M. et al., 2017; Ceren Ates, H. et al., 2020; Vuclin, T. et al., 2020]. Данные работы позволяют сформировать понимание терапевтического лекарственного мониторинга, как лабораторной отрасли, отражают цель и задачи мониторинга концентраций препаратов, демонстрируют группы лекарственных средств, требующих проведения терапевтического лекарственного мониторинга. Также, в работах ведущих специалистов в области лекарственной токсикологии отражены принципы проведения терапевтического лекарственного мониторинга, его основные этапы, обсуждаются главные фармакокинетические параметры, показания к проведению ТЛМ и требования к препаратам для включения в перечень лекарственных средств, подлежащих терапевтическому лекарственному мониторингу [Родионов, Г.Г. и соавт., 2018; Saleem M.A. и соавт., 2020].

Отдельные работы посвящены аналитическому этапу терапевтического лекарственного мониторинга и используемым лабораторным методам, в которых рассматриваются основные преимущества и недостатки различных лабораторных систем [Verstraete A.G. et al., 2018; Shipkova M. et al., 2019]. Научные работы, отражающие лабораторные подходы проведения терапевтического лекарственного мониторинга, охватывают только общие вопросы использования различных лабораторных технологий. Сравнительные исследования иммунохимического и хроматографического методов не проводились, хотя отражался факт несопоставимости результатов исследований [Van Gelder T. et al., 2017; Ward G., et al., 2017; Hoffer E. et al., 2015].

Цель исследования: клинико-лабораторная оценка применения методов терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса у пациентов, перенесших трансплантацию сердца, для улучшения отдаленных результатов лечения.

Задачи исследования

1. Модифицировать и валидировать методику количественного определения эверолимуса в цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.
2. Провести сравнительную оценку лабораторной информативности иммунохимического метода и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в приложении к количественному определению эверолимуса в цельной крови.
3. Сравнить клиническую информативность количественного определения эверолимуса в цельной крови при использовании иммунохимического метода и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием у пациентов после трансплантации сердца в отдаленном периоде с целью выбора оптимального лабораторного метода терапевтического лекарственного мониторинга для улучшения результатов лечения.

Научная новизна исследования. В проведенном научном исследовании впервые продемонстрирован опыт применения лабораторного контроля за эффективностью и безопасностью терапии эверолимусом у пациентов после трансплантации сердца иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС.

Модифицирована, валидирована и успешно применена в клинической практике аналитическая методика количественного определения эверолимуса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в цельной крови пациентов после трансплантации сердца.

Впервые проведено сравнительное исследование лабораторной и клинической информативности иммунохимического метода и метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием для проведения терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца.

Впервые продемонстрировано, что использование высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием для проведения терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца достоверно снижает риски острого клеточного и антителоопосредованного отторжения трансплантата, улучшает течение болезни коронарных артерий пересаженного сердца и снижает частоту инфекционных осложнений иммуносупрессивной терапии.

Теоретическая и практическая значимость исследования. В лабораторную и клиническую практику внедрена аналитическая методика количественного определения эверолимуса в цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Модифицирован протокол выполнения предварительной подготовки образцов цельной крови к определению концентрации эверолимуса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, позволяющий увеличить чувствительность методики и уменьшить время подготовки образцов.

Показаны преимущества аналитических характеристик метода ВЭЖХ-МС/МС по сравнению с иммунохимическим анализом с демонстрацией конкретных величин абсолютного и относительного смещения результатов.

Продемонстрирована целесообразность выбора метода ВЭЖХ-МС/МС для проведения терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса у реципиентов сердечного трансплантата, как оптимального, за счет снижения рисков острого клеточного и антителоопосредованного отторжения, инфекционных осложнений и улучшения течения болезни коронарных артерий пересаженного сердца.

Теоретическая значимость работы заключается в научном обосновании и сопоставлении современных лабораторных технологий терапевтического лекарственного мониторинга для последующей клинической реализации с демонстрацией преимуществ каждого лабораторного метода, сопоставимости

результатов, полученных разными методами анализа и рекомендацией наиболее оптимальной.

Методология и методы исследования. Для достижения поставленной цели было выполнено: 1) анализ отечественной и зарубежной литературы; 2) экспериментальная лабораторная работа, целью которой являлась разработка аналитической методики количественного определения эверолимуса в цельной крови методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием сертифицированного высокотехнологичного лабораторного оборудования; 3) сравнительная оценка лабораторной информативности иммунохимического метода и ВЭЖХ-МС/МС для проведения ТЛМ эверолимуса, выполненная по алгоритму EP09с «Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples», рекомендованному CLSI; 4) ретроспективно-проспективное клиничко-лабораторное исследование в течение 4 лет наблюдения с целью оценки клинической информативности иммунохимического метода и ВЭЖХ-МС/МС для проведения ТЛМ эверолимуса у пациентов, находящихся на поддерживающей терапии эверолимусом после трансплантации сердца. Полученные данные обрабатывались современными статистическими методами.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Модифицированная и валидированная методика определения концентрации эверолимуса в цельной крови человека, реализуемая с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) может быть использована для количественного определения эверолимуса в цельной крови человека с целью проведения фармакокинетических исследований.
2. Аналитические характеристики высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием позволяют рассматривать технологию как «метод выбора» по сравнению с иммунохимическим анализом для проведения терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца.
3. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием для проведения терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца позволяет улучшить клинические исходы и снизить риски отторжения трансплантата.

Степень достоверности и апробации результатов. Модифицированная для исследования аналитическая методика количественного определения эверолимуса в цельной крови пациентов после трансплантации сердца успешно прошла контроль качества, согласно международному руководству по валидации биоаналитических методик [HHS/FDA/CDER/CVM. Bioanalytical method validation. Guidance for industry, 2018]. Исследование проведено на достаточном количестве образцов цельной крови, требуемом для оценки аналитического смещения с использованием проб пациентов и рекомендуемом Институтом клинических и лабораторных стандартов [CLSI.

EP09c, 2018]. Полученные результаты, используемые для оценки клинической информативности, обрабатывались с использованием современных статистических методов обработки медицинских данных. На проведение исследования получено одобрение этического комитета федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Материалы исследования и основные положения диссертации неоднократно докладывались и обсуждались на Всероссийских и Международных конференциях: VIII Ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов (г. Санкт-Петербург, 2016г.), международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро» (г. Санкт-Петербург, 2016г., 2017г., 2019г.), International Kongress «EUROMedica-Hannover» (Hannover, 2016г. и 2017г.), Всероссийской молодежной медицинской конференции с международным участием «Алмазовские чтения - 2018» (г. Санкт-Петербург, 2018г.); X Санкт-Петербургском научно-медицинском форуме «Врач-провизор-пациент - 2018» (г. Санкт-Петербург, 2018г.); 2-й межрегиональной научно-практической конференции и школе с международным участием «Безопасность лекарственных средств - острые фундаментальные и прикладные вопросы» (г. Санкт-Петербург, 2018г.).

Публикация результатов исследования. По теме исследования опубликовано 10 печатных работ, 4 из которых изданы в научно-практических журналах, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности 3.3.8 Клиническая лабораторная диагностика и 2 в журналах, входящих в перечень, индексируемых в Scopus.

Личный вклад автора. Диссертант лично разработал дизайн исследования, участвовал в организации и планировании научно-исследовательской работы, провел анализ литературных данных о современных лабораторных возможностях методов терапевтического лекарственного мониторинга. Автор лично принимала участие в выполнении лабораторной части работы. Модификация и валидация методики количественного определения эверолимуса в цельной крови, исследования проб пациентов эверолимуса методом ВЭЖХ-МС/МС выполнены лично автором. Все представленные в научной работе данные были статистически обработаны, интерпретированы и проанализированы с формулировкой выводов и практических рекомендаций лично диссертантом.

Внедрение результатов в практику. Полученные результаты представленной научно-исследовательской работы внедрены в деятельность центральной клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России. Теоретически значимые результаты внедрены в образовательный процесс кафедры лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста, состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение), заключения, выводов исследования и практических рекомендаций. Иллюстрирована 27 рисунками и 22 таблицами. Список литературы содержит 139 источников (57 отечественных и 82 зарубежных).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Исследование было выполнено в 3 этапа. На первом этапе была модифицирована и валидирована биоаналитическая методика определения концентрации эверолимуса в крови пациентов, перенесших трансплантацию сердца. Для выполнения данной части работы были проанализированы данные литературы, проведена экспериментальная работа по подбору условий хроматографического разделения биологической смеси и условий масс-спектрометрического детектирования для измерения уровня концентрации эверолимуса в крови, выполнена оценка приемлемости разработанной методики, произведены межлабораторные сличительные испытания на реальных образцах пациентов. Второй этап был посвящен оценке лабораторной информативности, а именно вычислению показателя смещения по алгоритму, рекомендованному руководством «Сравнение методов и оценка аналитического смещения с использованием образцов пациентов», предложенного Национальным комитетом по разработке клинических и лабораторных стандартов. На третьем этапе был проведен анализ клинической информативности иммунохимического метода и ВЭЖХ-МС/МС при реализации лекарственного мониторинга эверолимуса у реципиентов сердечного трансплантата. Показателями клинической информативности выступали осложнения иммуносупрессивной терапии эверолимусом (острое клеточное и антитело-опосредованное отторжение трансплантата, болезнь коронарных артерий пересаженного сердца, анемия, лейкопения, тромбоцитопения, дислипидемия, инфекционные заболевания).

Научная работа основана на исследовании данных 15 пациентов (9 мужчин, 6 женщин), которым в период с 2011 по 2015 года по жизненным показаниям была выполнена ортотопическая трансплантация сердца. Средний возраст больных - 57 лет (от 34 до 66 лет). Средний срок после трансплантации сердца – 4,5 года. Общая продолжительность наблюдения за пациентами составила 1460 дней. За период наблюдения было выполнено 500 измерений концентрации эверолимуса в цельной крови иммунохимическим методом, и 500 – методом ВЭЖХ-МС/МС. Все пациенты, на момент трансплантации сердца, находились в III и IV функциональном классе сердечной недостаточности по классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA). Пациенты, включенные в исследование, получали индукционную терапию тимоглобулином (1 чел.) или базиликсимабом (14 чел.). Стандартная трехкомпонентная поддерживающая иммуносупрессивная терапия в исследуемой группе включала: ингибиторы кальциневрина (такролимус), микофенолата мофетил, глюкокортикостероиды

(метилпреднизалон). В период от 3 мес. до 4 лет после трансплантации сердца пациентам исследуемой группы была проведена конверсия на эверолимус.

С целью оценки клинической информативности иммунохимического метода и ВЭЖХ-МС/МС для проведения фармакокинетического мониторинга эверолимуса у реципиентов трансплантированного сердца производился учет клинического состояния пациентов путем анализа дневников пациентов, заполняемых курирующим кардиологом в медицинской информационной системе ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» QMS в день сдачи образцов крови, а также анализ результатов лабораторных исследований. Для диагностики острого клеточного, антителоопосредованного отторжения трансплантата и выявления поражений коронарных артерий всем пациентам исследуемой группы в плановом порядке выполнялось коронарографическое исследование с регулярностью 1 раз в год, или внепланово по показаниям с проведением эндомиокардиальной биопсии.

Лабораторные методы исследования.

Всем пациентам, включенным в исследование, для проведения общего клинического и биохимического анализа крови производился забор крови одновременно с забором для количественного определения эверолимуса в утренние часы, натощак, перед приемом следующей дозы препарата в вакуумные пробирки VACCUETTE с КЗ-ЭДТА и активатором свёртывания, соответственно. Забор крови выполнялся из локтевой вены.

Общий клинический анализ крови выполнялся непосредственно после забора крови на гематологическом анализаторе Cell-Dyn Ruby Abbott (США) с автоматическим подсчетом лейкоцитарной формулы.

Исследование липидного спектра производилось на автоматическом биохимическом анализаторе фирмы Abbot Architect 8000 с расчетом коэффициента атерогенности.

Количественное определение эверолимуса в пробах пациентов иммунохимическим методом проводилось с использованием иммунохимического анализатора Abbott «Architect i2000» и тест-систем фирмы QMS Everolimus/Thermo Scientific.

Количественное определение эверолимуса в пробах пациентов методом ВЭЖХ-МС/МС проводилось с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа фирмы Agilent Technologies «Agilent 1260 Infinity», трехквадрупольного масс-спектрометрического детектора фирмы Agilent Technologies «Agilent 6400 series Triple Quadrupole» и валидированной методики количественного определения эверолимуса в цельной крови человека. Для подбора оптимальных аналитических условий использовали растворы, которые готовились из стандартной фармакологической субстанции эверолимуса чистотой более 98,5% эверолимуса (Fluka, 07741), в качестве внутреннего стандарта выступал изотопно-меченный аналог эверолимуса - эверолимус-d4 (Santa Cruz Biotechnology, sc-21845).

Статистическая обработка данных. Для качественной обработки, полученных в процессе исследования, масс-хроматограмм использовалась

программа MussHunter Qualitative analysis B.07.00. Количественный анализ результатов, полученных методом ВЭЖХ-МС/МС выполнялся с помощью программы MussHunter Quantitative analysis B.07.00.

Все результаты представленной научно-исследовательской работы были собраны в электронную базу данных, сформированную при помощи Microsoft Excel 2010.

Для описания количественных данных были использованы стандартные показатели описательной статистики (число наблюдений, среднее арифметическое значение, стандартное отклонение). Статистическая обработка данных проводилась при помощи программы GraphPad Prism 9.5.1 и СТАТИСТИКА (версия 10) с использованием корреляционного анализа для оценки связи между количественными переменными, критерия Манна-Уитни для анализа количественных переменных в двух независимых группах. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Модифицированы условия хроматографического разделения, детекции эверолимуса и внутреннего стандарта, используя высокоэффективный жидкостной хроматограф фирмы Agilent Technologies «Agilent 1260 Infinity» и трехкврупольный масс-спектрометрический детектор фирмы Agilent Technologies «Agilent 6460 series Triple Quadrupole» с системой ионизации «Agilent Jet Stream – электроспрей» (табл. 1). Для количественного анализа использовался метод внутреннего стандарта, которым выступал изотопно-меченный аналог эверолимуса - эверолимус-d4. В качестве базисной методики была взята методика, разработанная в ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России на аналогичном оборудовании, созданная согласно техническому заданию, составленному совместно с ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России для лабораторного комплекса «высокоэффективный жидкостный хроматограф «LC 1200 Infinity» (Agilent, США) с масс-спектрометрическим детектором «TripleQuard 6440» с системой ионизации «ESI», отличающегося источником ионизации масс-спектрометра. Источник ионизации «Agilent Jet Stream – электроспрей» обладает технологией термической фокусировки, что позволяет пятикратно увеличить чувствительность.

Таблица 1. Модифицированные условия для количественного определения эверолимуса в цельной крови человека, используя высокоэффективный жидкостной хроматограф фирмы Agilent Technologies «LC 1260 Infinity» и трехкврупольный масс-спектрометрический детектор фирмы Agilent Technologies «Agilent 6460 series Triple Quadrupole» с системой ионизации «Agilen Jet Stream - электроспрей».

Хроматограф	«LC 1260 Infinity» (Agilent, США)
Масс-спектрометрический детектор	«TripleQuard 6460» с системой ионизации «Agilent Jet Stream - электроспрей» (AJS ESI)

Продолжение таблицы 1	
Колонка	Poroshell 120 EC-C18 50 мм x 3.0 мм, 2.7 мкм (Agilent Technologies, США)
Условия хроматографического разделения	
Режим элюирования	Изократический
Скорость потока ПФ	0,4 мл/мин
Подвижная фаза	1) 100 мМ раствор формиата аммония в воде, содержащей 0,1% муравьиной кислоты (5%); 2) 100 мМ раствор формиата аммония в метаноле, содержащем 0,1% муравьиной кислоты (95%).
Объем ввода	5 мкл
Температура колонки	60 ⁰ С
Время удерживания эверолимуса	1 мин.
Полное время анализа	1,5 мин.
Условия масс-селективного детектирования	
Режим работы ионного источника	Режим регистрации положительных ионов
Температура газа	325 ⁰ С
Скорость потока газа	9 л/мин
Давление на небулайзере	20 psi
Режим сканирования	Мониторинг реакций заданный ионов
Прекурсор-ион для эверолимуса	975.6 ион
Ион-фрагмент для эверолимуса	908.5 ион
Прекурсор-ион для внутреннего стандарта	979.6 ион
Ион-фрагмент для внутреннего стандарта	912.5 ион
Напряжение на фрагменторе для эверолимуса	185
Напряжение на фрагменторе для внутреннего стандарта	170
Энергия в ячейке соударения для эверолимуса	15
Энергия в ячейке соударения для внутреннего стандарта	12

Экспериментальным путем разработана методика предварительной подготовки цельной крови. Разработанный протокол пробоподготовки проб

цельной крови пациентов включил следующие этапы: к 100 мкл крови добавляли 200 мкл осаждающего раствора (1% сульфат цинка в 80% метаноле), перемешивали 10 мин с помощью шейкера со скоростью 2400 об/мин, центрифугировали 10 мин со скоростью 6000 об/мин при 4 °С, отбирали 100 мкл супернатанта, к которому добавляли 100 мкл метанола, перемешивали 0,5 мин на шейкере со скоростью 2400 об/мин, после чего центрифугировали 10 мин со скоростью 6000 об/мин при 4 °С и отбирали 120 мкл супернатанта в хроматографическую вials для анализа. В силу более высокой чувствительности «TripleQuard 6460» с системой ионизации «Agilent Jet Stream-электроспрей» (AJS ESI), образцы не требовали дополнительного концентрирования, что позволило опустить этап жидкостной-жидкостной экстракции и значительно сократить время анализа, по сравнению с другой аналитической базой.

Проведено тестирование оптимизированной методики на соответствие международным требованиям к валидации биоаналитических методик, которое продемонстрировало пригодность хроматографической системы (табл. 2).

Таблица 2. Соответствие показателей хроматографической системы международным требованиям к валидации биоаналитических методик.

Параметр	Значение	Требования
Число теоретических тарелок (ЧТТ)	4100+/-500	Не менее 2000 ТТ
Коэффициент асимметрии пика	1,66+/-0,14	Не более 2,0

Время удерживания аналита при данных условиях составило – 0,848 (+/- 0,001) мин.

Нижний предел количественного определения представленной методики составил – 1 нг/мл (рис. 1), что полностью удовлетворяет клиническим требованиям.

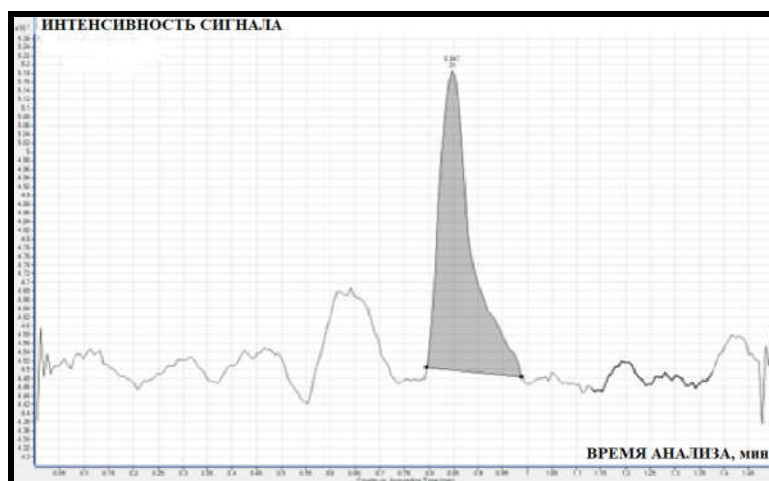


Рисунок 1. Хроматограмма стандартного образца с концентрацией зверолимуса, соответствующей НПКО (1 нг/мл). Аналит в данной концентрации определяется в виде узкого симметричного пика с соотношением сигнал/шум не менее 10:1.

Оценка линейности метода продемонстрирована в диапазоне концентраций от 1 до 20 нг/мл, что удовлетворяет клиническим требованиям, так как терапевтический диапазон для пациентов после пересадки сердца составляет от 3 до 8 нг/мл (рис. 2). Калибровочная кривая была построена на 9 калибровочных стандартных образцах, при минимально необходимых 6. Коэффициент детерминации составил (R^2) – 0,999. Масс-хроматограммы калибровочных образцов продемонстрированы на рисунках 3 и 4. Результаты измерения калибровочных образцов отображены в таблице 3.

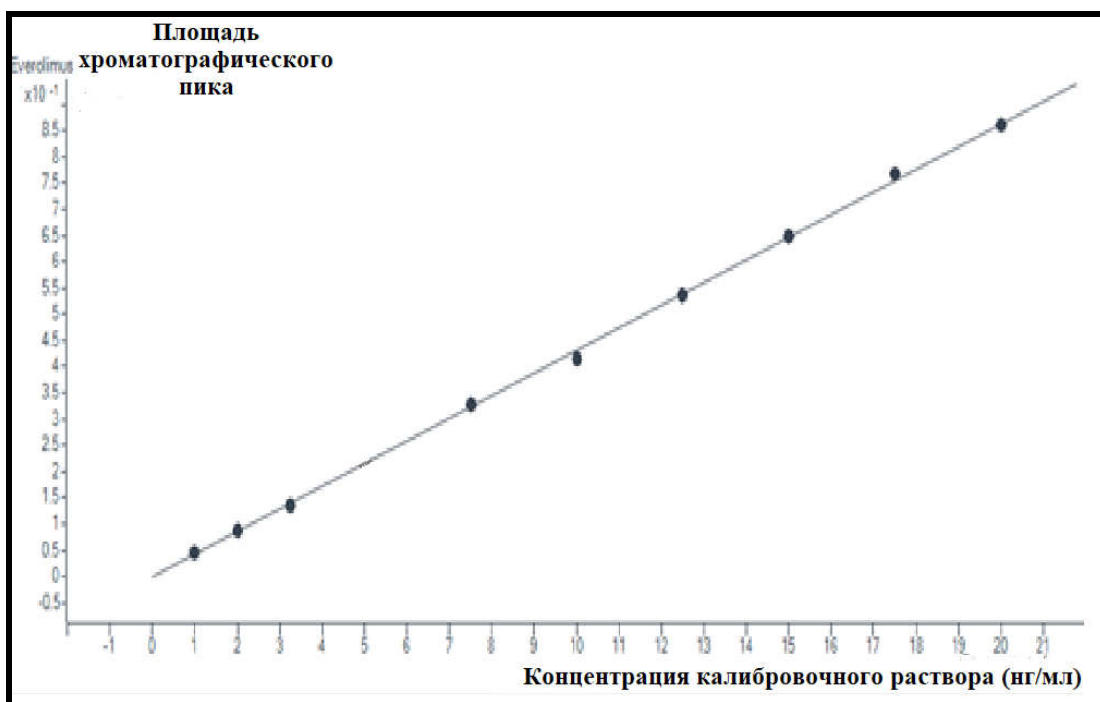


Рисунок 2. Калибровочная зависимость для количественного определения эверолимуса в цельной крови человека, используя модифицированную методику.

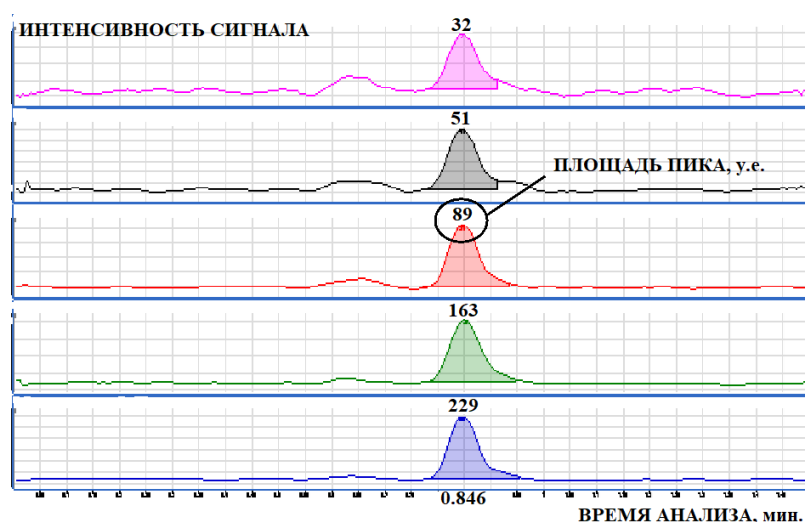


Рисунок 3. Масс-хроматограммы калибровочных образцов (концентрация эверолимуса в образцах - 1 нг/мл, 2 нг/мл, 3,25 нг/мл, 7,5 нг/мл, 10 нг/мл).

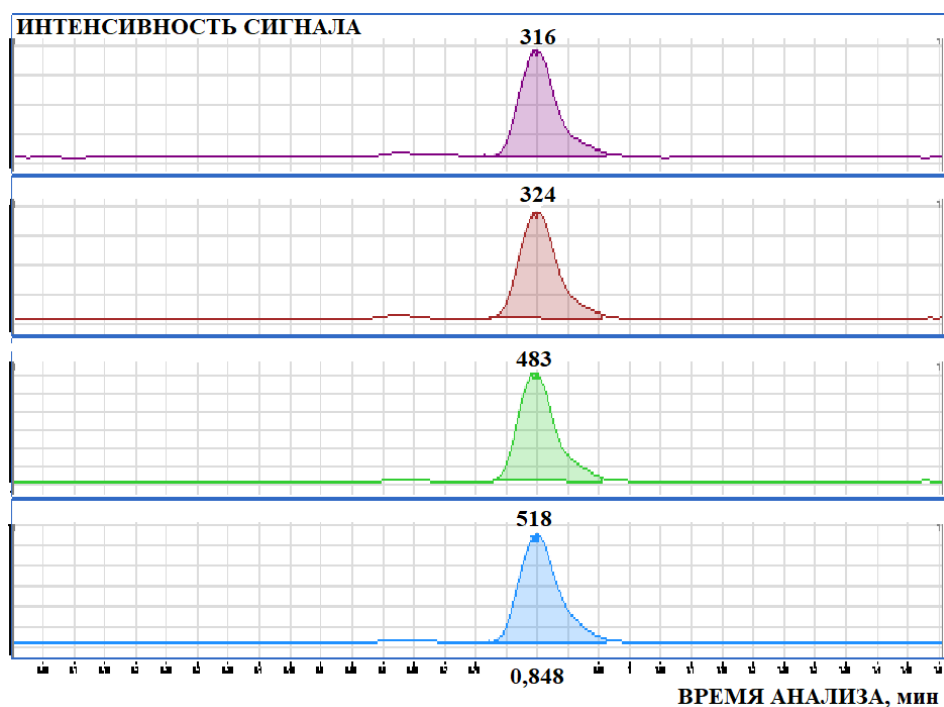


Рисунок 4. Масс-хроматограммы калибровочных образцов (концентрация эверолимуса в образцах – 12,5 нг/мл, 15 нг/мл, 17,5 нг/мл, 20 нг/мл).

Таблица 3. Результаты измерения калибровочных образцов

П/П образец	Целевая концентрация, нг/мл.	Время удерживания, мин.	Площадь пика, ус. ед.	Результат, нг/мл	Отклонение, %
1	1 нг/мл	0,845	32	1,03 нг/мл	3,6
1	2 нг/мл	0,845	51	1,82 нг/мл	9
2	3,25 нг/мл	0,848	89	3,39 нг/мл	4,6
3	7,5 нг/мл	0,849	163	7,44 нг/мл	0,8
4	10 нг/мл	0,846	229	10,1 нг/мл	1
5	12,5 нг/мл	0,847	316	12,9 нг/мл	3,5
6	15 нг/мл	0,848	324	14,4 нг/мл	4
7	17,5 нг/мл	0,845	483	18,1 нг/мл	3,4
8	20 нг/мл	0,848	518	19,5 нг/мл	2,4

Отклонение результатов исследования стандартов НПКО от целевой концентрации не превысило 20%, отклонение результатов исследования всех стандартов (кроме НПКО) от целевой концентрации не превысило 15%, что удовлетворяет требованиям к линейности биоаналитических методик (табл. 4).

На этапе валидации разработанной методики была произведена оценка селективности методики путем анализа проб интактной крови, забранной от 6 здоровых доноров, не принимающих эверолимус. Пробоподготовка и анализ образцов производился согласно вышеуказанным условиям. Селективность методики признана удовлетворительной на основании того,

что на полученных масс-хроматограммах отсутствовали пики, превышающие по площади 20% от значения площади пика стандартного образца эверолимуса (рис. 5).

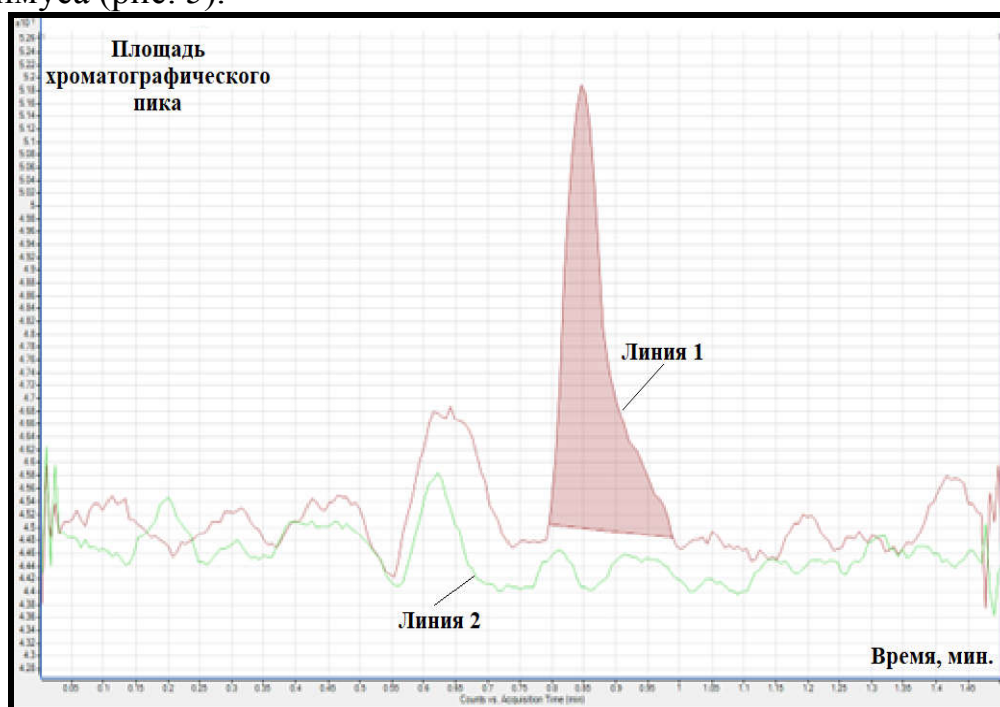


Рисунок 5. Хроматограмма стандартного образца с концентрацией эверолимуса, соответствующей НПКО (1 нг/мл) – линия 1, наложенной на хроматограмму отрицательной контрольной пробы – линия 2.

Оценка воспроизводимости методики произведена на четырёх уровнях концентраций в количестве 5 повторений (табл. 4).

Таблица 4. Результаты оценки воспроизводимости методики

Контрольный образец	Целевая концентрация	Результат	Отклонение от целевого значения, %
№1 – 1е измерение	1 нг/мл	1,1 нг/мл	10
№1 – 2е измерение	1 нг/мл	0,95 нг/мл	5
№1 – 3е измерение	1 нг/мл	0,86 нг/мл	14
№1 – 4е измерение	1 нг/мл	1,08 нг/мл	8
№1 – 5е измерение	1 нг/мл	0,98 нг/мл	2
№2 – 1е измерение	3 нг/мл	3,05 нг/мл	2
№2 – 2е измерение	3 нг/мл	3,2 нг/мл	6
№2 – 3е измерение	3 нг/мл	2,97 нг/мл	9
№2 – 4е измерение	3 нг/мл	2,89 нг/мл	4
№2 – 5е измерение	3 нг/мл	3,15 нг/мл	5
№3 – 1е измерение	10 нг/мл	10,3 нг/мл	3
№3 – 2е измерение	10 нг/мл	9,8 нг/мл	2
№3 – 3е измерение	10 нг/мл	9,2 нг/мл	8
№3 – 4е измерение	10 нг/мл	10,1 нг/мл	1
№3 – 5е измерение	10 нг/мл	10,9 нг/мл	9

Продолжение таблицы 4			
№4 – 1е измерение	20 нг/мл	19,2 нг/мл	4
№4 – 2е измерение	20 нг/мл	19,9 нг/мл	0,5
№4 – 3е измерение	20 нг/мл	20,3 нг/мл	1,5
№4 – 4е измерение	20 нг/мл	20,1 нг/мл	0,5
№4 – 5е измерение	20 нг/мл	20,7 нг/мл	3,5

Результаты контроля воспроизводимости признаны приемлемыми, т.к. полученные значения концентраций контрольных образцов не превышают 15% от теоретической величины концентрации, а значения контрольных образцов, соответствующих нижнему пределу количественного обнаружения не превышают 20%.

Прецизионность методики (табл. 5) оценивали путем расчета коэффициента вариации результатов пятикратного измерения контрольных образцов на пяти уровнях концентраций: 1 нг/мл, 2 нг/мл, 5 нг/мл, 7,5 нг/мл, 20 нг/мл.

Таблица 5. Прецизионность измерения эверолимуса в контрольных образцах в течение дня.

Концентрация эверолимуса в контрольном образце, нг/мл	В течение 1 дня (5 измерений для каждого контрольного образца)		
	Mean (нг/мл)	SD (нг/мл)	SD (%)
1,0	0,8	0,05	11,51
2,0	2,02	0,05	6,01
5,0	4,87	0,16	7,53
7,5	7,4	0,09	2,78
20,0	20,26	0,3	3,39

Контроль прецизионности методики признан удовлетворительным, т. к. коэффициент вариации каждого образца контроля качества не превышает 15% от теоретической величины концентрации, а коэффициент вариации образцов на уровне нижнего предела количественного обнаружения не превышает 20%.

Модифицированная методика протестирована согласно международным требованиям к валидации биоаналитических методик, что доказало состоятельность и пригодность методики для клинического применения.

Проведён внешний контроль качества методики, путём одновременного проведения количественного определения эверолимуса в образцах пациентов, перенесших трансплантацию сердца и принимающих препарат, посредством вышеописанной методики и в НИЛ токсикологии и лекарственного мониторинга НИО биоиндикации ФГБУ «Всероссийский

центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России методом ВЭЖХ-МС/МС в количестве 20 образцов. Полученная разница в результатах не превышала 14%, при допустимых 20% (рис. 6).

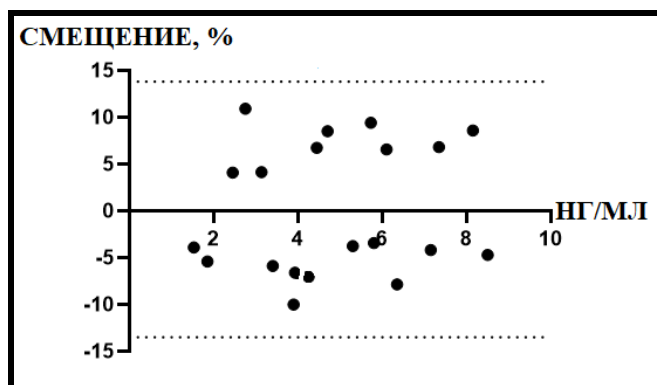


Рисунок 6. Демонстрация относительного смещения между результатами количественного определения эверолимуса в крови пациентов, выполненного методом ВЭЖХ-МС/МС.

По результатам сравнительной оценки лабораторной информативности иммунохимического метода и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в приложении к количественному определению эверолимуса в цельной крови у пациентов после трансплантации сердца на 50 образцах (согласно руководству «Сравнение методов и оценка аналитического смещения с использованием образцов пациентов», предложенного Национальным комитетом по разработке клинических и лабораторных стандартов) с использованием программы GraphPad Prism 9.5.1 рассчитан показатель смещения (bias). Показатели абсолютного смещения варьируют от 0,01 нг/мл (Bc-low) до 4,38 нг/мл (Bc-high). Средний показатель смещения составил – 1,82 нг/мл (рис. 7).

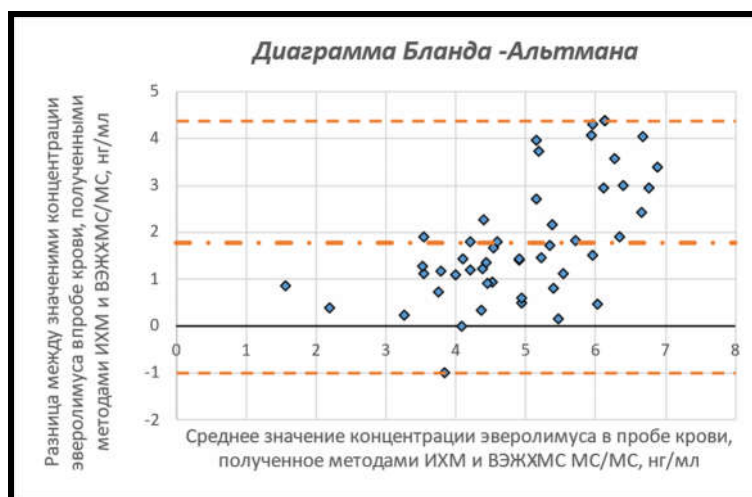


Рисунок 7. Диаграмма Бланда-Альтмана (график соответствия) для иммунохимического метода и ВЭЖХ-МС/МС в приложении к количественному определению эверолимуса.

Таким образом, среднее относительное смещение составило – 29% в большую сторону для результатов, полученных иммунохимическим методом.

Также стоит отметить, что анализ показал заметную положительную зависимость смещения от концентрации ($r=0,819$): чем выше концентрация препарата в образце, тем больше показатель смещения, что вероятно объясняется большим количеством метаболитов в крови (рис. 8).

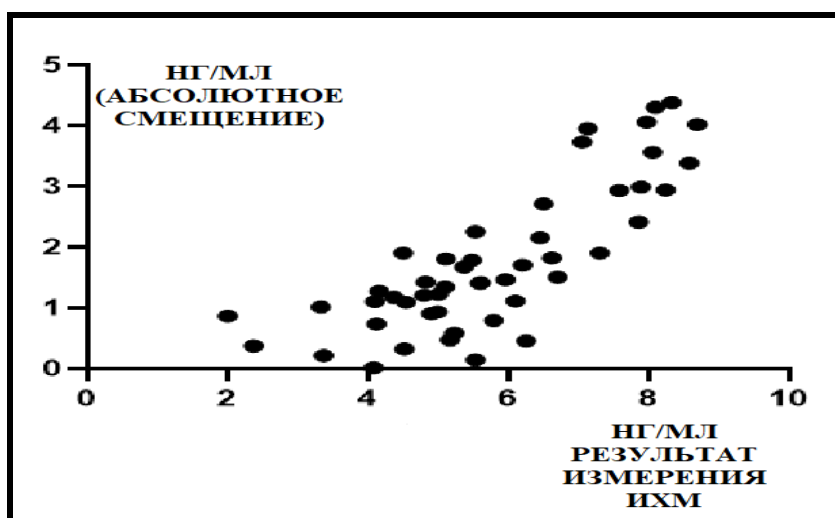


Рисунок 8. Корреляционная зависимость концентраций эверолимуса, измеренных ИХМ и показателями смещения результатов между ИХМ и ВЭЖХ-МС/МС.

С целью диагностики острого клеточного и антителоопосредованного отторжения сердечного трансплантата всем реципиентам проводилось ангиографическое исследование коронарных артерий и гистологическое исследование образцов эндомиокардиальных биоптатов.

За весь период наблюдения было выполнено 72 коронарографии и 101 гистологическое исследование. Результаты коронарографических исследований (рис. 9) показали достоверное различие ($p<0.001$) в динамике возникновения и течения болезни коронарных артерий пересаженного сердца в период проведения ТЛМ эверолимуса иммунохимическим методом и методом ВЭЖХ-МС/МС.

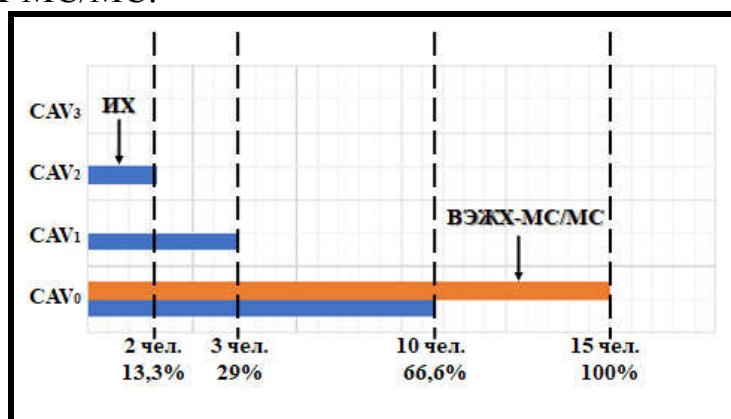


Рисунок 9. Степень тяжести поражения коронарных артерий у пациентов, включенных в исследование при проведении терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС.

За 2 года ведения пациентов, ориентируясь на данные ТЛМ, проведенного методом ВЭЖХ-МС/МС не было зафиксировано случаев прогрессирования заболевания, в то время как за предшествующий период использования иммунохимического метода, было выявлено 3 пациента с лёгкой степенью тяжести, 2 пациента с умеренной степенью тяжести поражения коронарного русла при болезни коронарных артерий пересаженного сердца, а также 2 пациентам потребовалось чрескожное коронарное вмешательство с постановкой стента.

По результатам исследования биоптатов, острое клеточное или антителоопосредованное отторжение было обнаружено у 10 пациентов из 15. В результате проведения 101 гистологического исследования в 29 случаях было обнаружено острое клеточное отторжение лёгкой степени тяжести (24 – в период ТЛМ эверолимуса иммунохимическим методом, 6 - в период ТЛМ эверолимуса ВЭЖХ-МС/МС), в 4 случаях - острое клеточное отторжение средней степени тяжести (в период ТЛМ эверолимуса иммунохимическим методом), 4 – антителоопосредованное отторжение AMR1 (в период ТЛМ эверолимуса иммунохимическим методом), 2 - антителоопосредованное отторжение AMR2 (в период ТЛМ эверолимуса иммунохимическим методом) (рис. 10). Таким образом, частота острого клеточного отторжения в период проведения ТЛМ методом ВЭЖХ-МС/МС была в 4,8 раза меньше, а случаи антителоопосредованного отторжения были зафиксированы только в период ТЛМ эверолимуса иммунохимическим методом.

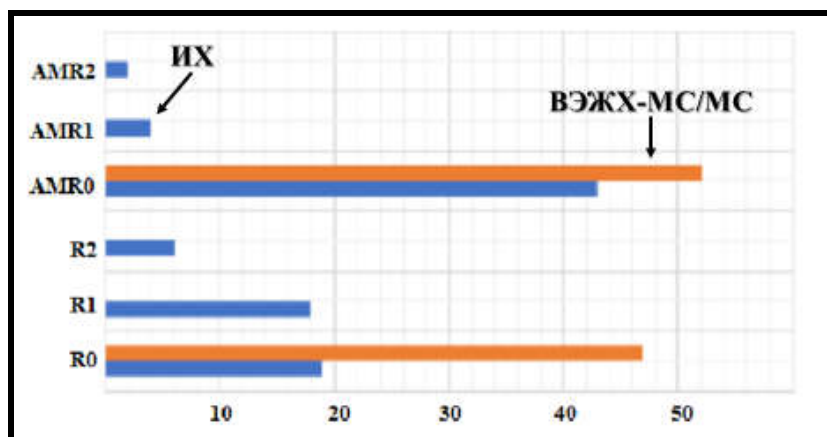


Рисунок 10. Результаты ЭМБ в исследуемой группе за весь период наблюдения.

За весь период исследования у всех пациентов было зафиксировано 49 случаев инфекционных заболеваний, из них 34 случая (69,4%) – в период проведения ТЛМ эверолимуса иммунохимическим методом, и 15 (30,6%) – в период внедрения ВЭЖХ-МС/МС, что в 2,3 раза меньше.

При оценке клинической информативности методов терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса нами исследовались также влияние выбора метода на развитие дислипидемий и гематологической токсичности (анемия, лейкопения, тромбоцитопения), описанных в литературе как наиболее частые эверолимус-индуцированные осложнения.

Была выявлена тенденция к более целевым уровням показателей липидного спектра, а именно общего холестерина и триглицеридов, в период проведения использования ВЭЖХ-МС/МС, однако многофакторная зависимость данных показателей требует более детального исследования на большей выборке больных. Достоверных различий по показателям гематологической токсичности в двух группах выявлено не было.

ВЫВОДЫ

- 1) Модифицированная аналитическая методика количественного определения эверолимуса в цельной крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием отвечает международным требованиям, предъявляемым к показателям валидации биоаналитических методик, демонстрируя высокую и достаточную точность, чувствительность, селективность, воспроизводимость, прецизионность и линейность, и может быть успешно использована для терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца.
- 2) Упрощенный протокол подготовки образцов цельной крови, исключая этап жидкостно-жидкостной экстракции, может быть реализован при использовании масс-спектрометра с системой ионизации «электроспрей» с технологией термической фокусировки в качестве детектора, и позволяет сократить время выполнения анализа.
- 3) Иммунохимический метод определения концентрации эверолимуса в цельной крови у пациентов после трансплантации сердца демонстрирует смещение результатов измерения концентрации в сторону увеличения на 29% по сравнению с высокоэффективной жидкостной хроматографией с масс-селективным детектированием.
- 4) Корреляционный анализ результатов исследования лабораторной информативности продемонстрировал заметную положительную связь ($r=0.819$) показателей смещения от уровня концентрации препарата: чем выше концентрация препарата в образце, тем больше смещение между результатами, определяемыми каждым методом.
- 5) Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием, как метод проведения терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца, по сравнению с иммунохимическим анализом, снижает риски острого клеточного отторжения в 4,8 раз, демонстрирует снижение частоты антителоопосредованного отторжения, достоверно ($p<0.001$) улучшает течение болезни коронарных артерий пересаженного сердца, снижает частоту чрескожных коронарных вмешательств в течение 4 лет наблюдения.
- 6) Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием для проведения терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца снижает частоту инфекционных осложнений иммуносупрессивной терапии эверолимусом в 2,3 раза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать следующие практические рекомендации врачам-кардиологам, врачам-трансплантологам, врачам клинической лабораторной диагностики в области проведения терапевтического лекарственного мониторинга, клиническим фармакологам и врачам – токсикологам, занимающимся ведением пациентов, перенесших трансплантацию сердца и других солидных органов:

- 1) Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием должна быть использована в клинико-диагностических лабораториях для проведения терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса у пациентов, перенесших трансплантацию сердца.
- 2) При использовании в инструментально-лабораторном комплексе, реализующем метод ВЭЖХ-МС/МС, в качестве детектора масс-спектрометр с системой ионизации «электроспрей» с технологией термической фокусировки, рекомендована к применению оптимизированная аналитическая методика количественного определения эверолимуса в цельной крови с упрощенным протоколом подготовки образцов без этапа жидкостно-жидкостной экстракции.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Представленная научно-исследовательская работа затронула важные вопросы практического применения иммунохимического метода и ВЭЖХ-МС/МС в приложении к фармакокинетическому мониторингу эверолимуса у реципиентов сердца.

Дальнейшие сравнительные исследования лабораторной и клинической информативности иммунохимического метода и ВЭЖХ-МС/МС в приложении к другим лекарственным препаратам «критической дозы», на больших выборках пациентов и количествах измерений позволит решить проблему выбора лабораторного метода для лабораторий терапевтического лекарственного мониторинга.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований.

1. Безвуляк, Е.И. Оптимизация мониторинга концентраций эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца на фоне патологии печени / Е.И. Безвуляк, О.С. Мельниченикова, Т.В. Вавилова, М.А. Симоненко, Ю.В. Сазонова, П.А. Федотов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – 150(2): 68-73.
2. Безвуляк, Е.И. Фармакологические и лабораторные аспекты терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса / Е.И. Безвуляк, Т.В. Вавилова, В.А. Башарин, В.П. Куценко, П.Ю. Зубкова // MEDLINE.RU. – 2018. – Т. 19. – Ст. 29. – С. 392-406.

3. Пересада, Е.И. Функциональное состояние печени как один из факторов обеспечения безопасности и эффективности терапии эверолимусом / Е.И. Пересада, Т.В. Вавилова, В.А. Башарин, В.П. Куценко // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2019. – 168(8): 53-60.

4. Безвуляк, Е.И. Оптимизация метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием для количественного определения эверолимуса в крови пациентов после трансплантации сердца / Е.И. Безвуляк, Т.В. Вавилова, И.Э. Ушал, Г.Г. Радионов, И.И. Шантырь // Лабораторная служба. – 2023. – 12(3). – 29-36.

Статьи, тезисы докладов в материалах конференций

5. Пересада, Е.И. Профиль безопасности фармакотерапии у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени / Е.И. Пересада, П.В. Селиверстов, Т.В. Вавилова, В.А. Башарин, В.Г. Радченко // Медицинский совет. – 2019. – 3. – С. 69-75.

6. Безвуляк, Е.И. Количественное определение концентрации эверолимуса в цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / Е.И. Безвуляк, Е.В. Пелевина, Е.Ю. Васильева, Т.В. Вавилова // Трансляционная медицина. Тезисы VIII ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов. – 2016. – С. 49–50.

7. Bezvulyak E.I. Optimization of therapeutic drug monitoring for patients with heart transplantation / E.I. Bezvulyak, T.V. Vavilova // Archiv euromedica. – 2016. – V. 7. – N. 2. – P. 62.

8. Bezvulyak E.I. Optimization of therapeutic drug monitoring for patients with heart transplantation / E.I. Bezvulyak, T.V. Vavilova // Archiv euromedica. – 2017. – V. 7. – N. 2. – P. 62.

9. Безвуляк, Е.И. Влияние неалкогольной жировой болезни печени на достижение целевых концентраций эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца / Е.И. Безвуляк, О.С. Мельничникова, М.А. Симоненко // Трансляционная медицина. Тезисы Всероссийской молодежной медицинской конференции с международным участием «Алмазовские чтения - 2018». – 2018. – С. 245.

10. Безвуляк, Е.И. Влияние патологии печени на достижение целевых концентраций эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца / Е.И. Безвуляк, Т.В. Вавилова // Материалы 20-го Юбилейного Международного медицинского Славяно-Балтийского научного форума «Санкт-Петербург – Гастро-2018» и XIX Съезда НОГР (16-18 мая 2018 года). - 2. – 2018. – С. 55.

Список сокращений

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

НПКО – нижний предел количественного определения

ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЧТТ – теоретические тарелки

ЭМБ – эндомиокардиальная биопсия

Bc – bias

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute