

*На правах рукописи*

Козлов Алексей Владимирович

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА  
ДАБИГАТРАНА ДЛЯ ЗАДАЧ ФАРМАКОКИНЕТИКИ И  
ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2020

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Научный руководитель:**

Доктор фармацевтических наук,  
профессор

**Раменская Галина Владиславовна**

**Официальные оппоненты:**

**Шохин Игорь Евгеньевич** – доктор фармацевтических наук, ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», генеральный директор компании

**Гаевая Людмила Михайловна** – доктор фармацевтических наук, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова», опытно-технологический отдел, ведущий научный сотрудник

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России).

Защита состоится «16» сентября 2020 г. в «14.00» часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.09 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д. 13.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1, и на сайте организации: <http://sechenov.ru/>

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета **280.040.09**  
доктор фармацевтических наук,  
профессор



**Демина Наталья Борисовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения и Федеральной службы государственной статистики Российской Федерации, сердечно-сосудистые заболевания занимают ведущие место среди заболеваний в странах с высоким и средним уровнем развития и благополучия.

Среди сердечно-сосудистых заболеваний самые тяжелые – инфаркт, инсульт и тромбоэмболии. Последние в клинической практике встречаются чаще всего. От этой патологии страдают около 40 % - взрослого населения в мире, 15 % – в Европе и 19,4 % – в России.

Основным средством профилактики и борьбы с тромбоэмболией легочной артерии, венозными тромбоэмболическими осложнениями и тромбоэмболией глубоких вен выступает комплексная терапия, включающая, в том числе, антикоагулянты.

Преимущества этой терапии состоят в том, что антикоагулянты воздействуют на механизм образования тромба, не требуют хирургического вмешательства и их можно применять как стационарно, так и амбулаторно.

При всех положительных качествах антикоагулянтной терапии - одного из самых эффективных методов лечения данных заболеваний, возникновение побочного эффекта – кровотечения, до настоящего времени полностью не исключено. При применении препаратов раннего поколения (гепарин, варфарин, ацетилсалициловая кислота и др.) побочные эффекты проявляются чаще.

На протяжении последних десятилетий для лечения тромбофилии и снижения риска тромбоэмболических осложнений, наряду с известными препаратами – гепаринами, фондапаринуксом натрия, варфарином и некоторыми другими, широкое распространение находят новые оральные антикоагулянты (НОАК) – апиксабан, ривароксабан и дабигатран, для которых доказана также высокая профилактическая эффективность. В последние годы появились сообщения о возникновении нежелательных лекарственных реакций при применении НОАК. В качестве вероятного объяснения приводится полиморфизм генов, которые отвечают за активность фермента карбоксиэстеразы и гликопротеина-Р, участвующих в метаболизме данных препаратов.

В связи с этим, для установления оптимального режима дозирования, при проведении научных исследований фармакокинетики и терапевтического лекарственного мониторинга необходимы чувствительные и селективные методики, с помощью которых количественно определяют в крови содержание указанных антикоагулянтов.

Таким образом, разработка современной селективной методики для изучения фармакокинетических параметров дабигатрана и проведения терапевтического мониторинга при его применении крайне актуальна и перспективна.

### **Степень разработанности темы исследования**

В проведенных ранее исследованиях дабигатрана были установлены терапевтические дозы: минимальная – 40 мг, максимальная – 400 мг. Концентрацию дабигатрана в плазме крови определяли высокоэффективной жидкостной хроматографией с масс-спектрометрическим детектором.

Нами проведен анализ различных методик определения препарата в плазме крови для терапевтического мониторинга.

Было выявлено, что применяемые методики не учитывают влияние эндогенных липофильных компонентов и/или других препаратов, которые влияют на хроматографические параметры препарата и селективность обнаружения дабигатрана.

### **Цель и задачи настоящего исследования**

Цель исследования – разработать селективную методику количественного определения дабигатрана в плазме крови и обосновать её применимость на примере терапевтического лекарственного мониторинга пациентов после операции по эндопротезированию на коленном суставе.

### **Задачи исследования**

1. Изучить применяемые аналитические методы количественного определения дабигатрана в плазме крови.
2. Разработать методику количественного определения дабигатрана в плазме крови, пригодную для изучения его фармакокинетики и проведения лекарственного мониторинга с целью рационализации фармакотерапии. Выбрать оптимальные условия пробоподготовки и хроматографирования.
3. Провести валидацию методики количественного определения дабигатрана в плазме крови с целью ее приемлемости в соответствии с критериями валидации.

4. Применить разработанную методику анализа дабигатрана в плазме крови пациентов для фармакокинетических исследований терапевтического лекарственного мониторинга.

#### **Научная новизна**

Разработана и валидирована методика количественного определения дабигатрана в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС, имеющая широкий аналитический диапазон и высокую селективность. Данная методика может быть применена, как для терапевтического лекарственного мониторинга, так и для проведения фармакокинетических исследований. Разработанная методика отличается от ранее предложенных процедурой очистки пробы от белков и липофильных эндогенных компонентов за счет последовательного применения ацетонитрила и дихлорометана, что обеспечивает точность анализа, не допускает размывания пиков и элюирования анализируемого вещества с мертвым временем.

Была установлена концентрация дабигатрана в плазме крови у 30 пациентов послеоперационного периода. Были рассмотрены уровни концентрации препарата в терапевтическом диапазоне дозирования от 40 мг до 400 мг в зависимости от периода полувыведения 7 часов и 14 часов. Была установлена взаимосвязь содержания дабигатрана в плазме крови человека от индивидуальных особенностей.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В процессе работы проведена валидация биоаналитической методики количественного определения дабигатрана в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС.

Мониторинг концентраций дабигатрана в крови пациентов по предложенной методике позволяет выявлять индивидуальные особенности фармакокинетики дабигатрана у пациентов, что обеспечивает персонализированный подход к лечению и уменьшает риск возникновения побочных эффектов.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

- Биоаналитическая методика количественного определения дабигатрана в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС.
- Результаты валидации биоаналитической методики количественного определения дабигатрана в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС по следующим

характеристикам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, эффект матрицы и стабильность.

– Результаты исследования фармакокинетики дабигатрана в плазме крови пациентов, перенесших операцию на коленном суставе при терапевтическом приеме препарата.

### **Методология и методы исследования**

Методология исследования построена на анализе и обобщении литературных данных, оценке степени разработанности и актуальности темы, существующих подходов к изучению фармакокинетики лекарственных средств. Выбор методов анализа заключался в изучении физико-химических свойств препарата, подборе оптимальных условий пробоподготовки, хроматографирования, и фармакокинетических расчетах.

В процессе работы был использован метод ВЭЖХ-МС/МС. Статистическая обработка результатов исследования выполнялась с помощью программы Quant Analysis, входящей в пакет Bruker Compass и Microsoft Excel.

### **Достоверность научных положений и выводов**

Для проведения экспериментальных работ использовано современное сертифицированное оборудование и проведена валидация аналитической методики. Анализ полученных результатов, проведённый с применением методов статистической обработки, позволяет считать их достоверными.

### **Апробация результатов исследования**

Основные положения работы и результаты исследования доложены на:

– IV, V и VI международных научных конференциях молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (г. Шымкент, 2016-2018 гг.);

– VII международной научно-методической конференции «Фармообразование-2018» (г. Воронеж, 2018 г.).

Работа апробирована на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

### **Личный вклад автора**

Автору принадлежит ведущая роль в выполнении описанных экспериментальных исследований, разработке и валидации методики, анализе и обобщении полученных результатов, проведении аналитической и статистической обработки результатов, написании публикаций. Диссертация и автореферат написаны лично автором. Клиническая часть (отбор проб у пациентов, сбор анамнеза, генетическое тестирование, биохимический анализ) проведены в Федеральном Государственном бюджетном образовательном учреждении дополнительного профессионального образования Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования (ФГБОУ ДПО РМАНПО) Минздрава России под руководством член-корреспондента РАН, профессора Сычева Д.А.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствует области исследования специальности, конкретно - 3 и 4 пункту паспорта специальности.

### **Внедрение результатов исследования**

Методика количественного определения дабигатрана внедрена на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Разработанная биоаналитическая методика количественного определения дабигатрана в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС была применена в фармакокинетических исследованиях на базе ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России с целью проведения терапевтического мониторинга для обеспечения эффективной и безопасной терапии дабигатрана в плазме крови пациентов, перенесших операцию на коленном суставе, при курсовом терапевтическом приеме препарата.

### **Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки**

Выполнение диссертационной работы проводилось в рамках плана и в соответствии с тематикой научно-исследовательской работы на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), по

теме «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования». Номер государственной регистрации 01.2.011.68237.

### **Объем и структура диссертации**

Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит список сокращений, 21 таблицу, 27 рисунков и приложение. Диссертационная работа состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, трех глав описания экспериментальных исследований и полученных данных, общих выводов и библиографии. Список цитированной литературы включает 124 литературных источников, в том числе 67 - на иностранном языке.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 2 - в журналах, рекомендованных ВАК РФ и 2 - в изданиях, включенных в базу данных Scopus.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### ***Материалы и методы исследования***

В диссертационной работе использовано следующее оборудование: высокоэффективный жидкостной хроматограф («Dionexultimate 3000», Германия) с масс-детектором («Bruker micrOTOF-QII», Германия); шейкеры для перемешивания жидкостей («Genius 3» и «Vortex», США); центрифуга («Eppendorf», Германия) и система для получения воды Simplicity UV с УФ лампой («MerckMillipore», Германия).

Фармацевтические субстанции дабигатрана и дейтерированный дабигатран M+4, предоставлены ФГБОУ ДПО РМАНПО.

Реактивы: ацетонитрил для HPLC чистотой 99,9 % («LabScan», Польша); вода ультрачистая (не более 10 МОм\*см), полученная на системе Simplicity UV с УФ лампой («MerckMillipore», Германия); кислота муравьиная для HPLC, 50 % («Fluka», Швейцария); метилен хлористый (дихлорометан) химически чистый, (Химмед, РФ); диметилсульфоксид (ДМСО).

Растворы дабигатрана готовили:

-исходный, путем растворения фармацевтической субстанции дабигатрана в ДМСО до концентрации 1 мг/мл;

- калибровочные, последовательным разведением исходного раствора водой до концентраций 5, 10, 15, 50, 100, 500, 750 и 1000 нг/мл.



Раствор внутреннего стандарта (ВС) - дейтерированного дабигатрана М+4, готовили путем растворения 10 мг фармацевтической субстанции (точная навеска) в 10 мл ДМСО до концентрации 1 мг/мл и, затем, разводили исходный раствор дейтерированного дабигатрана М+4 водой до концентрации 0,5 нг/мл.

Калибровочные растворы и образцы контроля качества (QC) готовили в плазме, полученной от интактных субъектов, путем добавления 20 мкл стандартных растворов дабигатрана к 180 мкл плазмы крови.

В работе использовали плазму крови здоровых добровольцев и пациентов, получающих фармакотерапию (не включающую дабигатран) в соответствии с заболеванием, и пациентов, принимающих дабигатран.

Количественное определение дабигатрана в плазме крови проводили у 30 пациентов, принимавших капсулированный препарат в дозировке 220 мг один раз в день после операции по эндопротезированию на коленном суставе.

При проведении исследования анализировали две пробы плазмы крови каждого пациента: первая - перед приемом дозы дабигатрана (отбиралась в 9:00), вторая - через 3 ч после приема (отбиралась в 12:00).

### *Результаты исследования*

Разделение проводили на колонке AgilentZorbax SB-CN, 150x4,6 мм, 5 мкм, при температуре 35 °С. Подвижная фаза: ацетонитрил - 0,1 % с водным раствором муравьиной кислоты (20:80); режим элюирования - изократический; скорость потока подвижной фазы - 0,4 мл/мин; масс-спектрометрическое детектирование проводили с помощью ионизации в электроспрее. Положительные ионы определяли в режиме полного ионного тока с помощью множественных реакций. Время удерживания дабигатрана составило 4,7 мин. Масс-спектрометрические переходы в режиме МС были зарегистрированы для дабигатрана и ВС  $m/z$  472,2 и 476,2, соответственно (рисунки 1 и 2). В режиме МС/МС детектирования получили характеристичные интенсивные переходы  $m/z$  472,2 → 289,1 - для дабигатрана и  $m/z$  476,2 → 293,1 - для ВС (рисунки 3 и 4). Газ фрагментации - аргон. Энергия соударения - 22,2 эВ.

Настройки ионного источника: напряжение на капилляре - 4500 В; давление распыляющего газа - 2,0 бар, скорость осушающего газа - 7,0 л/мин, температура - 250 °С.

Пробоподготовка образцов плазмы крови проводилась методом жидкость-жидкостной экстракции по следующей методике:

- в пробирку помещали 200 мкл плазмы и 20 мкл раствора ВС, перемешивали встряхиванием на лабораторном шейкере в течение 15-30 сек;

- добавляли 600 мкл ацетонитрила, затем опять подвергали встряхиванию в течение 15-30 сек, и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин для осаждения белков;

- из полученной смеси отбирали 700 мкл в пробирку типа «Эппендорф» и добавляли 1000 мкл дихлорометана;

- полученную эмульсию еще раз перемешивали на лабораторном шейкере в течение 2 мин и разрушали путем центрифугирования при 14000 об/мин в течение 5 мин.

Для хроматографирования отбирали 100 мкл полученного верхнего водно-ацетонитрильного слоя. Данная методика позволяет избавиться от разбавления пробы ацетонитрилом и повысить чувствительность метода.

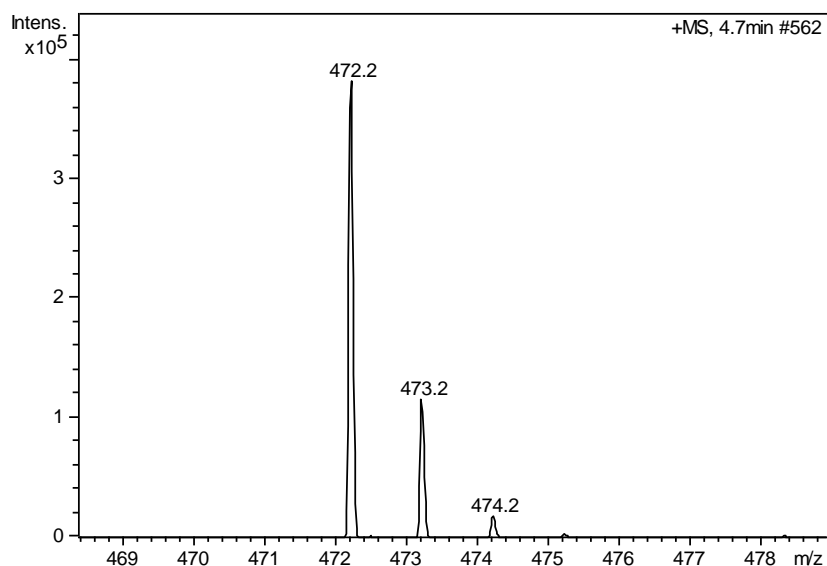


Рисунок 1. Фрагмент масс-спектра раствора дабигатрана

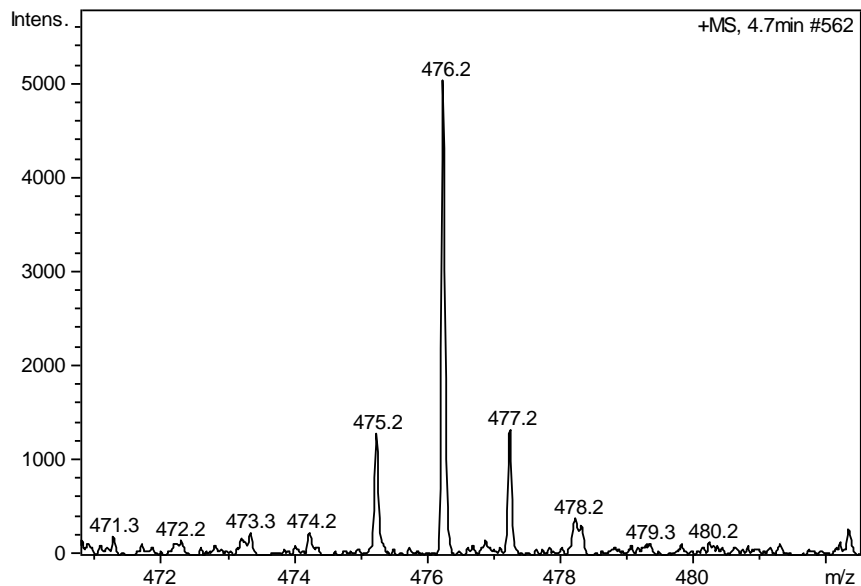


Рисунок 2. Фрагмент масс-спектра раствора ВС

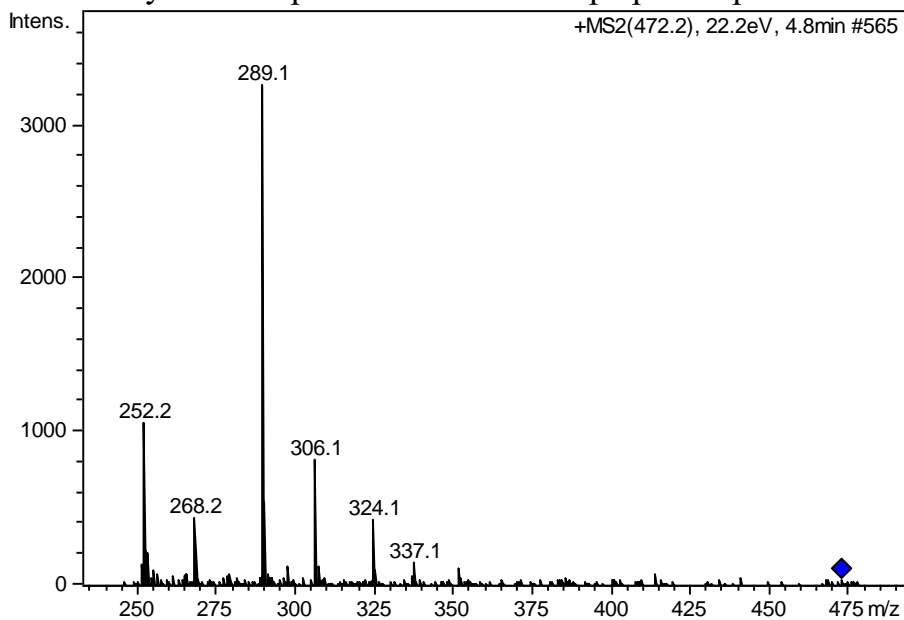


Рисунок 3. Фрагмент масс-спектра раствора дабигатрана (после фрагментации)

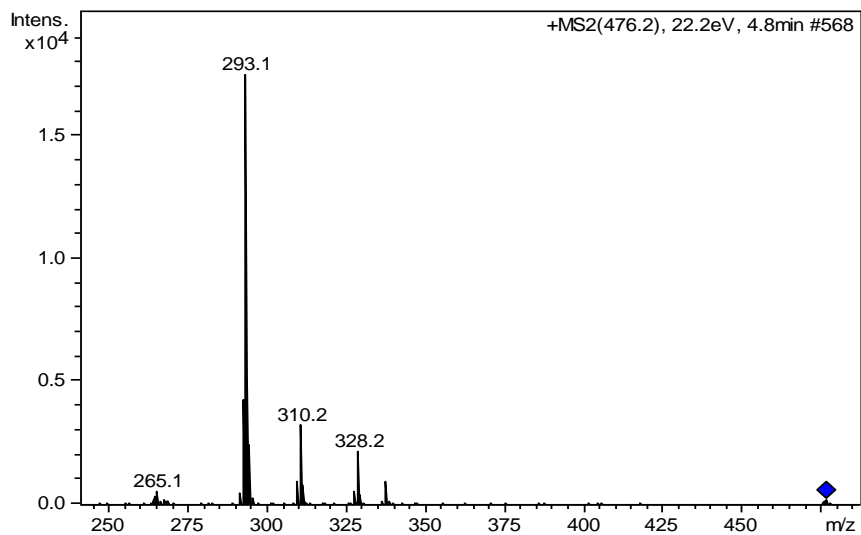
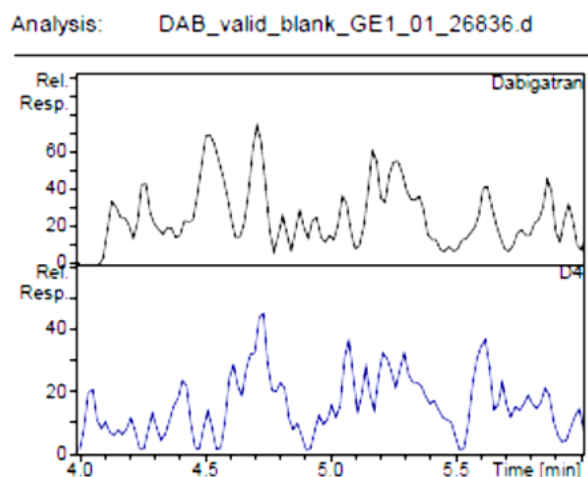


Рисунок 4. Фрагмент масс-спектра раствора ВС (после фрагментации)

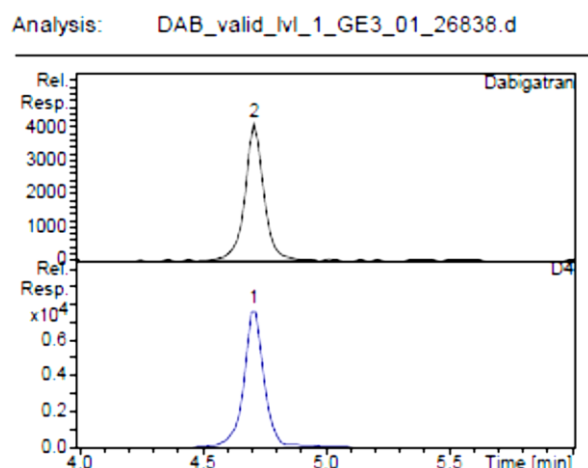
В работе критерии приемлемости валидационных параметров разработанной биоаналитической методики оценивались в соответствии с требованиями российских и международных документов – «Руководство по экспертизе лекарственных средств», FDA и ЕМА.

### *Селективность*

На рисунках 5 и 6 представлены хроматограммы, показывающие высокую селективность выбранного метода. Установлено, что в данных условиях эндогенные соединения не мешают определению анализируемого вещества и ВС.



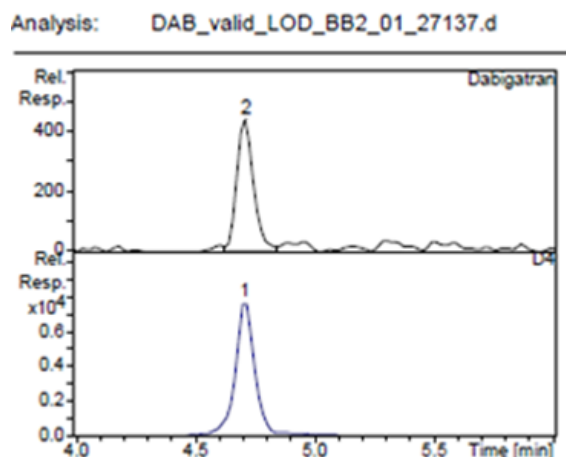
**Рисунок 5.** Хроматограмма плазмы крови, не содержащей дабигатрана и ВС (бланк-проба)



**Рисунок 6.** Хроматограмма плазмы крови, содержащей 5 нг/мл дабигатрана и ВС

### *Предел обнаружения, предел количественного определения*

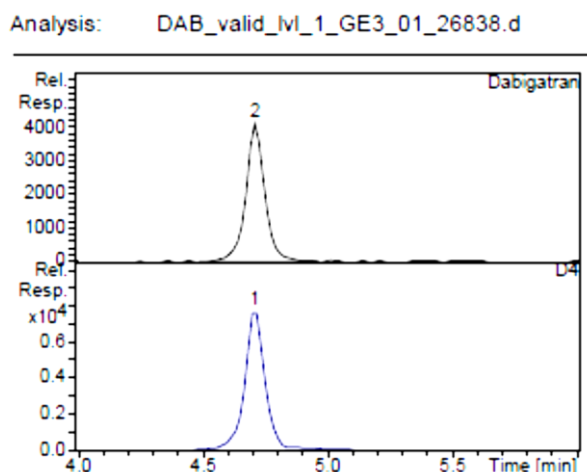
Предел обнаружения (LOD) дабигатрана в плазме крови (рисунок 7) при помощи данной методики установили равным 0,5 нг/мл.



**Рисунок 7.** Хроматограмма пробы плазмы крови, содержащей дабигатран соответствующий LOD (0,5 нг/мл) и ВС

Нижний предел количественного определения (LLOQ) дабигатрана в плазме крови был установлен на уровне 5 нг/мл, что позволяет определять его с достаточной точностью и прецизионностью.

Хроматограмма плазмы крови с концентрацией дабигатрана на уровне LLOQ представлена на рисунке 8.



**Рисунок 8.** Проба плазмы крови, содержащая дабигатран на уровне LLOQ (5 нг/мл) и ВС

### *Линейность*

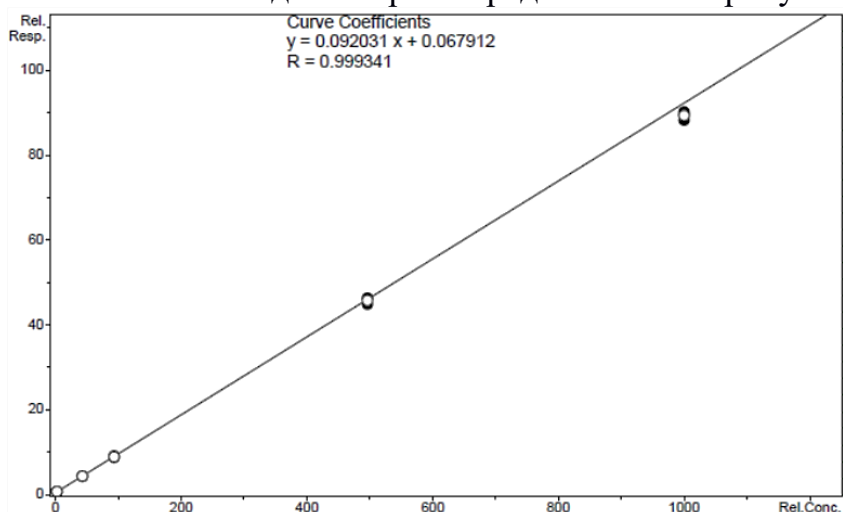
Шесть калибровочных образцов с концентрацией дабигатрана от 5 до 1000 нг/мл, а также нулевая проба (бланк + ВС) были приготовлены в плазме крови по описанной выше методике и проанализированы 3-хратно.

Статистические параметры калибровочной зависимости дабигатрана представлены в таблице 1. Отклонения от номинальной концентрации для всех калибровочных образцов не превышали допустимые значения (20 % - для LLOQ и 15 % - для остальных стандартов).

**Таблица 1.** Статистические параметры калибровочной зависимости

Истинная концентрация, нг/мл	n	Средняя рассчитанная концентрация, нг/мл	Точность, %	SD	CV, %
5,00	3	4,80	96,0	0,24	4,9
10,00	3	10,80	108,0	0,55	5,1
50,00	3	50,16	100,3	0,44	0,9
100,00	3	99,21	99,2	2,11	2,1
500,00	3	497,94	99,6	8,78	1,8
1000,00	3	968,54	96,9	11,06	1,1
$y = 0,092031 x + 0,067912$					
$R = 0,999341$					

Калибровочная зависимость дабигатрана представлена на рисунке 9.



**Рисунок 9.** Калибровочный график дабигатрана в плазме крови (Ось x - истинные концентрации дабигатрана в плазме крови, нг/мл. Ось y - отношение площадей хроматографических пиков дабигатрана и ВС)

#### *Прецизионность и точность*

Определение точности и прецизионности метода проводили при 6-кратном анализе 4-х образцов QC (образцы контроля качества) QC 1, QC 2, QC 3, QC 4, в области ожидаемого концентрационного диапазона в течение 3-х независимых серий анализа.

Полученные результаты, представленные в таблицах 2 и 3, позволяют установить, что значения точности и прецизионности для разработанной методики количественного определения дабигатрана в плазме крови соответствуют вышеуказанным критериям.

**Таблица 2.** Показатели внутрисерийной точности и прецизионности

Наименование параметров	Образец контроля качества			
	QC 1	QC 2	QC 3	QC 4
Истинная концентрация, нг/мл	5	15	500	750
Измеренная концентрация, нг/мл	4,7	14,7	536,4	768,8
	4,5	15,7	530,0	770,3
	4,3	14,6	501,4	786,7
	4,4	14,5	539,9	783,7
	5,0	15,3	558,7	761,4
	4,4	15,1	546,6	788,9
Среднее значение	4,6	15,0	535,5	776,6
Среднее отклонение (SD)	0,3	0,5	19,4	11,3
Точность, %	91,0	99,8	107,1	103,6
Прецизионность (CV), %	5,6	3,1	3,6	1,5
Количество анализов (n)	6	6	6	6
Калибровочная кривая	$y = 0,092031 x + 0,067912$			
	$R = 0,999341$			

**Таблица 3.** Показатели межсерийной точности и прецизионности

Наименование параметров	Образец контроля качества			
	QC 1	QC 2	QC 3	QC 4
Истинная концентрация, нг/мл	5	15	500	750
Измеренная концентрация, нг/мл	4,6	15,0	535,5	776,6
	4,6	14,7	503,7	753,9
	4,3	15,3	526,3	794,5
Среднее значение	4,5	15,0	521,8	775,0
Среднее отклонение (SD)	0,2	0,3	16,4	20,4
Точность, %	89,8	100,1	104,4	103,3
Прецизионность (CV), %	3,9	2,0	3,1	2,6
Количество анализов (n)	18	18	18	18

*Эффект влияния матрицы*

Изучение эффекта влияния матрицы проводили на двух концентрационных уровнях, соответствующих QC 2 и QC 3. Сравнивали референтные образцы и водные растворы сравнения. Водные растворы сравнения готовили путем добавления к 180 мкл воды по 20 мкл дабигатрана и ВС.

Значения матричных факторов для дабигатрана для низкой и высокой концентрации дабигатрана составило 1,99 и 1,61. Значения матричного фактора для ВС в зависимости от серии анализируем проб, так же колеблется в пределах 1,63-2,08, что закономерно, так как ВС дабигатрана – его дейтерированный аналог и имеет те же физико-химические свойства и закономерности ионизации.

Для абсолютного матричного фактора  $CV < 15\%$  показывает, что матричный эффект проявляется стабильно и разбросы в его значениях между пробами приемлемы.

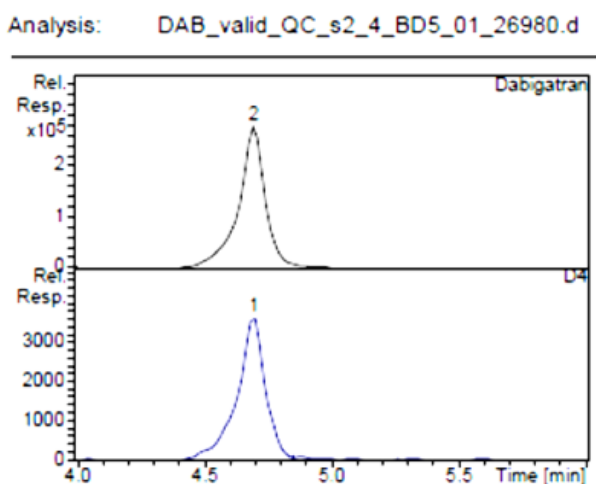
### *Степень извлечения*

Определение степени извлечения дабигатрана проводили для низкой и высокой концентраций, соответствующих уровням QC 2 и QC 3.

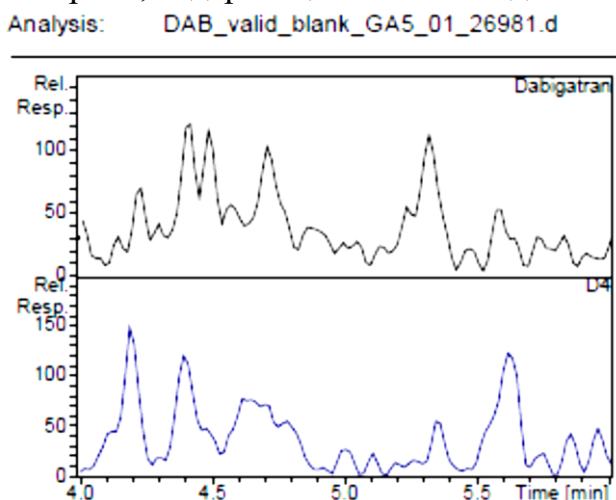
Степень извлечения дабигатрана, в зависимости от концентрации дабигатрана, находится в пределах 70,3-76,6 %, а ВС - 68,1-77,9 %. С повышением концентрации дабигатрана, показатели степени извлечения из дабигатрана и ВС увеличиваются, что объясняется их одинаковыми физико-химическими свойствами, так как ВС дабигатрана представляет собой его дейтерированный аналог. Потери дабигатрана и ВС в ходе пробоподготовки составляют 31,9-22,1 % и являются следствием перехода части веществ в хлористый метилен при удалении ацетонитрила из пробы.

### *Эффект переноса*

Перенос вещества из пробы в пробу (carry-over) оценивали путем 6-ти кратного последовательного анализа проб, содержащих 750 нг/мл дабигатрана и ВС и чистой плазмы (плазмы не содержащей дабигатран, бланк образец) - рисунок 10 и 11.



**Рисунок 10.** Проба, содержащая 750 нг/мл дабигатрана и ВС



**Рисунок 11.** Бланк образец, проанализированный сразу после пробы, содержащей 750 нг/мл дабигатрана и ВС



Сигналы дабигатрана и ВС в бланковом образце не обнаруживались, что свидетельствует об отсутствии переноса веществ при переходе от большей концентрации к меньшей.

#### *Стабильность при замораживании/размораживании*

Определение стабильности проводили на двух концентрационных уровнях, соответствующих QC 2 и QC 3 (15 и 500 нг/мл). Проводили два цикла замораживания/размораживания. Каждый цикл замораживания длился около 20 часов в морозильной камере при температуре минус 40 °С и размораживании при комнатной температуре не более 3 часов.

Изменения концентраций дабигатрана между циклами незначительны. Отклонения концентраций препарата после первого и второго цикла замораживания составляют не более 2,2 % - для низкой концентрации и не более 5,7 % - для высокой. Соответственно, дабигатран в плазме крови устойчив к многократному замораживанию и размораживанию.

#### *Краткосрочная и долгосрочная стабильность растворов дабигатрана и ВС*

Исследования проводили на двух стандартных растворах дабигатрана с концентрациями 150 и 5000 нг/мл. Растворы содержат 10-ти кратную концентрацию дабигатрана и ВС.

Установленные отклонения составило для дабигатрана в обеих концентрациях - 2,2 %, для ВС - 1,2 % при исследовании краткосрочной стабильности. Разница в площадях хроматографических пиков при исследовании долгосрочной стабильности увеличилась. Для дабигатрана низкой концентрации отклонения составили 12,3 %, высокой - 12,7 % и для ВС - 5,1 %.

### **Изучение фармакокинетики дабигатрана**

Разработанная нами методика количественного определения дабигатрана в плазме крови человека была применена для определения уровня дабигатрана в крови пациентов хирургического профиля с целью оптимизации его режима дозирования.

У каждого пациента концентрацию дабигатрана определяли в двух пробах крови: перед приемом очередной дозы дабигатрана – минимальная концентрация  $C_{\min}$  и через 3 часа после приема дабигатрана – максимальная концентрация  $C_{\max}$ .

Измеренные индивидуальные уровни минимальной и максимальной концентраций дабигатрана приведены в таблице 4.

**Таблица 4.** Концентрации дабигатрана у пациентов хирургического профиля (n=30)

Статистические параметры	Возраст, лет	Концентрация дабигатрана, нг/мл	
		$C_{\min}$	$C_{\max}$
Среднее значение	61,8	28,3	212,4
Среднее квадратическое отклонение	9,3	21,1	165,3
Медиана	62,0	22,3	165,2
Min значение	37,0	6,2	24,5
Max значение	81,0	95,0	800,4

При анализе результатов исследования, представленных в таблице 5, было обнаружено не соблюдение критерия Колмогорова-Смирнова на нормальное распределение (асимптотическая значимость  $p < 0,05$ ). В связи с этим, полученные значения концентраций далее представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (25 % и 75 %), а для расчета достоверности различий использовали непараметрические методы статистики (критерий Манна-Уитни).

Концентрация дабигатрана по группе:

- до приема ( $C_{\min}$ ): Me (25 %; 75 %) 22,3 (13,0; 36,4) нг/мл, Min - 6,2 нг/мл, Max - 95,0 нг/мл,

- через 3 ч после приема ( $C_{\max}$ ): Me (25 %; 75 %) 165,2 (105,2; 262,2) нг/мл, Min - 24,5 нг/мл, Max - 800,4 нг/мл.

Наблюдаемый значительный разброс значений концентраций до и после приема дабигатрана между пациентами, может быть связан с индивидуальными различиями в активности ферментов, участвующих в метаболизме препарата, а также с индивидуальными физиологическими особенностями пациентов (значение почечного клиренса и другие).

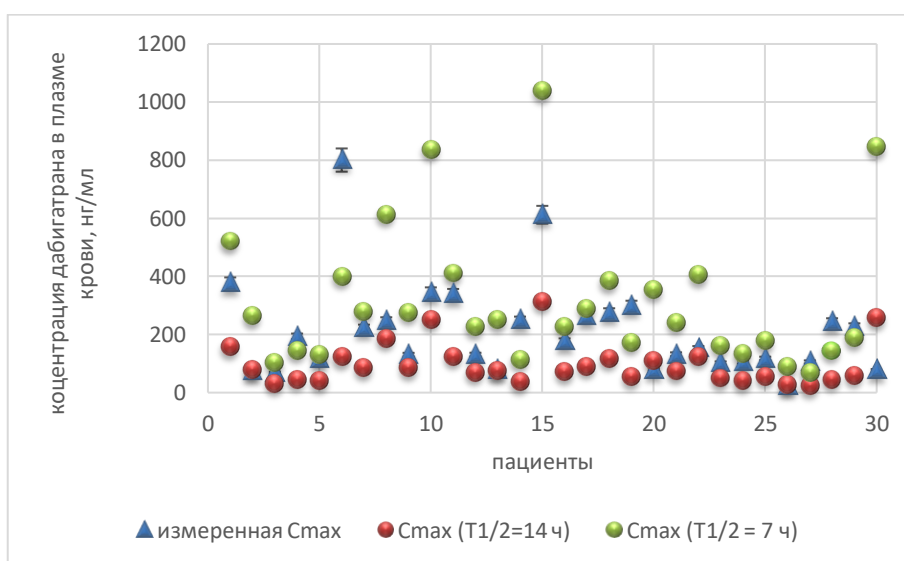
Также для каждого пациента нами были рассчитаны теоретические значения  $C_{\max}$  в зависимости от периода полувыведения. Известно, что обычно  $T_{1/2}$  дабигатрана составляет 7 - 9 ч и увеличивается до 12 - 14 ч у пожилых пациентов. Нами были проведены расчеты теоретической концентрации, основывающиеся на минимальном  $T_{1/2} = 7$  ч и максимальном  $T_{1/2} = 14$  ч.

Полученные экспериментально (измеренные) и рассчитанные значения концентрации дабигатрана представлены в таблице 5.

**Таблица 5.** Измеренные и рассчитанные концентрации ( $C_{\max}$ ) дабигатрана у пациентов хирургического профиля (n=30)

Статистические параметры	Возраст, лет	Концентрация дабигатрана, нг / мл		
		измеренная $C_{\max}$	рассчитанная $C_{\max}$	
			$T_{1/2} = 14$ ч	$T_{1/2} = 7$ ч
Медиана	62,0	165,2	73,2	243,7
25 %	-	105,2	42,8	142,5
75 %	-	262,2	119,4	397,5
Min значение	37,0	24,5	20,2	67,3
Max значение	81,0	800,4	311,8	1037,3

Полученные экспериментально  $C_{\max}$  у каждого пациента сравнили с расчётными значениями. Эти данные представлены на рисунке 13.



**Рисунок 13.** Графическое изображение  $C_{\max}$ , полученных в эксперименте и рассчитанных концентраций дабигатрана при двух значениях  $T_{1/2}$  у пациентов хирургического профиля

Из рисунка 13 видно, что у большинства пациентов определенная в эксперименте  $C_{\max}$  находится в диапазоне расчетных концентраций.

Далее всех пациентов разделили на три группы в зависимости от распределения измеренной концентрации дабигатрана в плазме крови по отношению к расчетным значениям (таблица 6).

**Таблица 6.** Распределение пациентов по группам в зависимости от  $C_{\max}$

Статистические параметры	Возраст, лет	Концентрация дабигатрана, нг / мл		
		измеренная $C_{\max}$	рассчитанная $C_{\max}$	
			$T_{1/2} = 14$ ч	$T_{1/2} = 7$ ч
Измеренная концентрация дабигатрана в пределах рассчитанного диапазона (n = 19)				
Медиана	61,0	152,6	82,1	273,1

Продолжение таблицы 6

25 %	-	114,7	52,8	175,6
75 %	-	276,5	123,0	409,2
Min значение	37,0	69,1	30,2	100,4
Max значение	75,0	612,2	311,8	1037,5
Измеренная концентрация дабигатрана <b>ниже</b> рассчитанного диапазона (n=4)				
Медиана	66,5	75,9	92,07	306,4
25 %	-	37,0	52,1	173,5
75 %	-	79,3	179,6	597,8
Min значение	64,0	24,5	25,9	86,14
Max значение	81,0	79,9	253,5	843,6
Измеренная концентрация дабигатрана <b>выше</b> рассчитанного диапазона (n=7)				
Медиана	61,0	243,7	42,8	142,5
25 %	-	193,6	33,4	111,7
75 %	-	301,3	56,1	186,6
Min значение	43,0	105,6	20,2	67,3
Max значение	70,0	800,4	119,4	397,5

Как видно из данных, представленных в таблице 7 и на рисунке 13, основное число пациентов (64 %) имеют измеренную  $C_{\max}$  в пределах рассчитанных цифр. У четырех пациентов (13 %) измеренная концентрация была ниже теоретической, а у семи пациентов (23 %) измеренная  $C_{\max}$  была выше рассчитанных значений. Статистически достоверных различий по возрасту между группами не обнаружено.

На рисунке 14 представлены медианные значения измеренных и рассчитанных  $C_{\max}$  по группам.

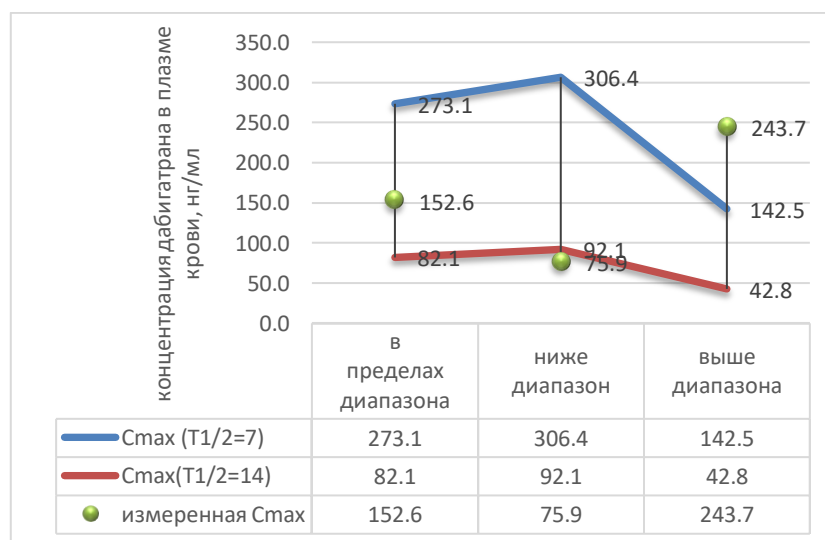


Рисунок 14. Средние значения измеренных и рассчитанных  $C_{\max}$  дабигатрана по группам

Известно, что метаболизм дабигатрана протекает с участием карбоксиэстеразы и гликопротеина-Р, активность которых зависит от генетического полиморфизма.

С целью установления взаимосвязи полученных значений концентраций дабигатрана с активностью ферментов было проведено сопоставление результатов с данными генетического теста, проведенного ранее в лаборатории ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, на обнаружение полиморфизма генов ABCB1 и CES1, которые отвечают за активность фермента карбоксиэстеразы и активность гликопротеина-Р и участвуют в метаболизме дабигатрана.

У 4 пациентов, имеющих измеренную концентрацию ниже рассчитанного диапазона, наблюдалось увеличение активности ферментов метаболизма, а у 7 пациентов, у которых измеренная концентрация превышала прогнозируемую, наблюдалось снижение активности ферментов метаболизма и выявление почечной недостаточности.

## **ОБЩИЕ ВЫВОДЫ**

1. В результате анализа научных литературных исследований рассмотрена патофизиология тромбоэмболии легочной артерии применяемые методы и методики ее терапии. Проведенный лекарственный мониторинг в диссертационной работе основано на применении современного лекарственного препарата дабигатран, обладающего эффективными и безопасными свойствами. Для фармакокинетических исследований содержания дабигатрана в плазме крови человека (количественных значений) использован один из самых эффективных и точных методов - метод ВЭЖХ.

2. Разработана новая методика ВЭЖХ-МС/МС в которой пробоподготовка модифицирована применением ацетонитрила и дихлорометана, позволившая повысить качество извлечения препарат из плазмы крови человека (очистку от липофильных эндогенных компонентов). Подобраны оптимальные условия хроматографического разделения.

3. Методика соответствует установленным нормативным отечественным и международным критериям валидации. Установлено, что валидационные показатели методики по критериям FDA и EMA: селективность, точность и прецизионность соответствуют критериям; отклонения стабильности - 3,4 и 7,2-7,6 %, не превышают нормативные требования - 15 %; эффект матрицы - около 100 % (устраняется разность ионизации); степень извлечения - 68,1-77,9 %; эффект переноса выше норматива в 4 раза и соответствует требованиям «Руководства по экспертизе лекарственных средств» Российской Федерации. Подтверждена устойчивость дабигатрана в плазме крови к многократному воздействию отрицательных температур. Отклонения концентрации препарата после циклов замораживания / размораживания составляет не более 2,2-5,7

%. Отклонения стабильности незначительные и на 50-65 % ниже нормативных требований.

В результате валидации новой методики ВЭЖХ-МС/МС получена линейность калибровочной характеристики (с новыми коэффициентами функции  $y = 0,092031 x + 0,067912$  и коэффициентом корреляции  $R = 0,999341$ ) и расширены возможности по пределу обнаружения (до уровня - 0,5 нг/мл).

4. Практической апробацией методики ВЭЖХ-МС/МС, в сравнении расчетными теоретическими концентрациями, в ходе терапевтического лекарственного мониторинга 30 пациентов установлено:

- экспериментальные значения концентрации дабигатрана у 63 % пациентов находятся в диапазоне теоретических концентраций, установленных нижней и верхней границами его полувыведения из организма с учетом допустимых отклонений;

- сравнением экспериментальных значений с теоретическими по периоду полувыведения  $T_{1/2}$  - 7 ч и  $T_{1/2}$  - 14 ч, выявлены пациенты (24 %) с высоким содержанием препарата в плазме крови относительно верхней границы диапазона. На основе результатов исследования и предоставленных данных по пациентам, и литературных источников по препарату можно предположить, что у них имеются нежелательные лекарственные реакции, связанные с дабигатраном.

Результаты исследований по разработке методики количественного анализа дабигатрана для задач фармакокинетики и лекарственного мониторинга свидетельствует о высокой сходимости результатов экспериментально-теоретических исследований, степени достоверности разработанной методики и эффективности определения критичных концентраций в плазме крови.

### **Практические рекомендации**

Разработанная методика количественного анализа дабигатрана для задач фармакокинетики и лекарственного мониторинга может быть предложена для дальнейшего применения в клинической практике в ходе обследования пациентов послеоперационного периода, принимающих препарат для профилактики возникновения ТЭЛА, ТГВ или ВТЭО с целью оптимизации режима дозирования дабигатрана. Методика, разработанная с использованием LC-MS/MS имеет перспективы дальнейшего применения в фармакокинетических исследованиях дабигатрана.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Перспективность дальнейшей разработки темы может быть предложена в направлении поиска научных решений по количественному определению дабигатрана в плазме крови пациентов в профилактике возникновения ТЭЛА и повышению безопасности и эффективности проводимой фармакотерапии в лекарственной терапевтической практике. Также есть перспективность в научном изучении влияния

генов, отвечающих за метаболизм дабигатрана, на фармакокинетические показатели препарата у пациентов разного пола, возраста и национальности при приеме данного препарата.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Козлов А.В.** Методы определения дабигатрана в биологических объектах / **А.В. Козлов**, Г.В. Раменская, Д.А. Сычев // Вестник ЮКГФА, 2016. - № 4 (77), Т. 2. – С. 130-131.
2. **Козлов А.В.** Валидация методики количественного анализа дабигатрана в крови человека / **А.В. Козлов**, Г.В. Раменская, В.В. Чистяков, Е.С. Степанова, Л.М. Макаренко // Вестник ЮКГФА, 2017. - № 4 (81), Т. 6. – С. 3-4.
3. **Козлов А.В.** Применение современных методов для анализа дабигатрана / **А.В. Козлов**, Г.В. Раменская // Вестник ЮКГФА, 2018. - № 4 (84), Т. 3. – С. 6-7.
4. **Козлов А.В.** Методы определения дабигатрана в лекарственной форме капсулы / **А.В. Козлов** // Сборник материалов 7-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2018». - Воронеж, 2018. - С. 681.
5. Sychev D. A. The impact of ABCB1 (rs1045642 and rs4148738) and CES1 (rs2244613) gene polymorphisms on dabigatran equilibrium peak concentration in patients after total knee arthroplasty / Sychev D. A., Levanov A. N., Shelekhova T. V., Bochkov P. O., Denisenko N. P., Ryzhikova K. A., Mirzaev K. B., Grishina E. A., Gavrillov M. A., Ramenskaya G. V., **Kozlov A. V.**, Bogoslovsky T. // **Pharmacogenomics and Personalized Medicine.** - 2018. – Vol. 11. – С. 127-137.
6. **Козлов А.В.** Современные подходы к поиску эффективных антикоагулянтов / **А.В. Козлов**, О.Ю. Щепочкина, О.И. Передеряев, В.И. Гегечкори, Ф.С. Байбуртский // **Естественные и технические науки**, 2019. - № 4. – С. 73-78.
7. **Козлов А.В.** Сравнительный анализ методик для количественного определения дабигатрана в плазме крови человека, прошедшие эндопротезирование коленного сустава / **А.В. Козлов**, В.В. Смирнов, Д.А. Сычев, О.П. Бочков, В.В. Чистяков, Е.С. Степанова, Л.М. Макаренко // **Химико-фармацевтический журнал**, 2019. – № 8, Т. 53. – С. 59-63.
8. Ramenskaya G.V. An improved extraction protocol for therapeutic dabigatran monitoring using HPLC-MS/MS / **Kozlov A.V.**, Ramenskaya G.V., Sychev D.A., Vlasov A.M., Makarenkova L.M., Stepanova E.S., Gegechkori V.I., Snezana Agatonovic-Kustrin, Chistyakov V.V. // **Journal of Chromatography B** – 2019. – Vol. 1130 - 1131. – С. 121808.