

УДК 615.074



АДАПТАЦИЯ МЕТОДА «ВЫСУШЕННОЙ КАПЛИ КРОВИ» ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА

В.И. Петров^{1,2}, И.С. Анিকেев^{1,2}, Т.Е. Заячникова³, А.В. Стрыгин^{1,2,4}, А.М. Доценко^{1,4}

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

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

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

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

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

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

⁴ Государственное бюджетное учреждение «Волгоградский медицинский научный центр»,
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

E-mail: Anikeev.iv@gmail.com

Получена 05.07.2022

После рецензирования 10.08.2022

Принята к печати 20.08.2022

Для контроля концентрации лекарственных препаратов, обладающих узким терапевтическим диапазоном, и проведения эффективных и безопасных методов лечения проводится терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ). Однако на сегодняшний день проведение ТЛМ связано с различными затруднениями, для решения которых разрабатываются более удобные и менее инвазивные методы сбора биологического материала.

Цель. Разработать протоколы взятия и хранения образцов «высушенной капли крови» (Dried Blood Spot, DBS), а также протоколы валидации методов количественного определения лекарственных препаратов в цельной крови с использованием данной технологии для последующего проведения терапевтического лекарственного мониторинга.

Материалы и методы. Для детального анализа метода «высушенной капли крови» и выявления характерных особенностей взятия и хранения биообразцов, был проведен сбор и анализ научной литературы за последние 10 лет. Поиск литературных материалов проводился с помощью открытых и доступных источников, размещенных в научных библиотеках учреждений, в электронных базах данных и поисковых системах: Elibrary, PubMed, Scopus, КиберЛенинка, Medline, ScienceDirect, Web of Science, Google Scholar. Подготовили первичные протоколы взятия, хранения и анализа образцов «высушенной капли крови». На стадиях отбора и хранения проводили апробацию и оптимизацию разработанных протоколов для получения образцов надлежащего качества. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием в качестве пробоподготовки «высушенную каплю крови», оптимизировали протоколы валидации лекарственных препаратов для обеспечения достижения приемлемых валидационных характеристик и проведения последующего ТЛМ.

Результаты. Выявлены особенности сбора, хранения и анализа образцов «высушенной капли крови». Определены такие характеристики, как: эффект объема капли, эффект гематокрита, однородность капли, которые могут оказывать влияние на результаты количественного ВЭЖХ-МС/МС анализа. Для успешного использования новой методики нами были разработаны надлежащие протоколы взятия образцов «высушенной капли крови» из пальца руки взрослых пациентов и из пятки новорожденных детей, а также протоколы валидации методов количественного определения лекарственных препаратов из данных образцов.

Заключение. Применение метода «высушенной капли крови» с использованием новых разработанных протоколов взятия, хранения и анализа биологических образцов снимает существующие ограничения при проведении ТЛМ, а также в последствии может стать перспективным методом для проведения доклинических и клинических исследований.

Для цитирования: В.И. Петров, И.С. Анিকেев, Т.Е. Заячникова, А.В. Стрыгин, А.М. Доценко. Адаптация метода «высушенной капли крови» для проведения терапевтического лекарственного мониторинга. *Фармация и фармакология*. 2022;10(4):331-342. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-331-342

© В.И. Петров, И.С. Анিকেев, Т.Е. Заячникова, А.В. Стрыгин, А.М. Доценко, 2022

For citation: V.I. Petrov, I.S. Anikeev, T.E. Zayachnikova, A.V. Strygin, A.M. Dotsenko. Adaptation of "dried blood drop" method for therapeutic drug monitoring. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(4):331-342. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-331-342

Ключевые слова: метод «высушенной капли крови»; терапевтический лекарственный мониторинг; биоанализ; валидация метода; ВЭЖХ-МС/МС

Список сокращений: ЛП – лекарственный препарат; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией; ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг; DBS – «высушенная капля крови»; QCL – низкий показатель контроля качества; QCM – средний показатель контроля качества; QCH – высокий показатель контроля качества; КК – контроль качества; НПКО – нижний предел количественного определения.

ADAPTATION OF “DRIED BLOOD DROP” METHOD FOR THERAPEUTIC DRUG MONITORING

V.I. Petrov^{1,2}, I.S. Anikeev^{1,2}, T.E. Zayachnikova³, A.V. Strygin^{1,2,4}, A.M. Dotsenko^{1,4}

¹ Volgograd State Medical University,

1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

² Scientific Center of Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University,

39, Novorossiyskaya Str., Volgograd, Russia, 400087

³ Institute for Continuing Medical and Pharmaceutical Education, Volgograd State Medical University,

1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

⁴ Volgograd Medical Research Center,

1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

E-mail: Anikeev.iv@gmail.com

Received 05 July 2022

After peer review 10 Aug 2022

Accepted 20 Aug 2022

To control the concentration of drugs with a narrow therapeutic range, and to conduct effective and safe treatments, Therapeutic Drug Monitoring (TDM) is carried out. However, to date, the implementation of TDM is associated with various difficulties, for the solution of which more convenient and less invasive methods for collecting biological material are being developed.

The aim of the study was to develop protocols for the collection and storage of “dried blood spot” (DBS) samples, as well as protocols for the validation methods for the quantitative determination of drugs in whole blood, using this technology for subsequent therapeutic drug monitoring.

Materials and methods. To analyze a “dried blood spot” method in detail and to identify the characteristic features of taking and storing biosamples, a collection and analysis of scientific literature over the past 10 years has been conducted. The search for literature materials has been carried out from open and accessible sources located in the scientific libraries of institutions, in electronic databases and search engines: Elibrary, PubMed, Scopus, Cyberleninka, Medline, ScienceDirect, Web of Science, Google Scholar. Primary protocols for taking, storing and analyzing samples of the “dried blood drop” have been prepared. To obtain the adequate quality samples, the developed protocols have been tested and optimized at the stages of selection and storage. By high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (HPLC-MS/MS), using a “dried blood drop” as a sample preparation, drug validation protocols have been optimized to ensure that acceptable validation characteristics were achieved, and subsequent Therapeutic Drug Monitoring was performed.

Results. The features of the collection, storage and analysis of the “dried blood spot” samples have been revealed. Such characteristics as a spot volume effect, a hematocrit effect, a droplet uniformity, which can affect the results of a quantitative HPLC-MS/MS analysis, have been determined. For a successful use of the new methods, appropriate protocols for taking samples of “dried blood spot” from the finger of adult patients and from the heel of newborns, as well as protocols for validating methods for the quantitative determination of drugs from these samples, have been developed.

Conclusion. The application of the “dried blood spot” method using newly developed protocols for taking, storing and analyzing biological samples, relieves the existing constraints in conducting TDM, and can later become a promising method for conducting preclinical and clinical studies.

Keywords: “dried blood spot” method; therapeutic drug monitoring; bioanalysis; method validation; HPLC-MS/MS

Abbreviations: MP/D – medicinal preparation/drug; HPLC-MS/MS – high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry; TDM – Therapeutic Drug Monitoring; DBS – Dried Blood Spot; QCL – low quality control; QCM – mean quality control; QCH – high quality control; QC – quality control; LLQL – lower limit of quantitation level.

ВВЕДЕНИЕ

«Высушенная капля крови» (от англ. Dried Blood Spot, DBS) – это метод пробоподготовки, который является относительно простым методом сбора

небольших объемов крови, с помощью которого можно пренебречь сбором плазмы и заморозкой образцов.

Метод «высушенной капли крови» представляет

широкий спектр возможных применений, которые невыполнимы или затруднены в исполнении традиционными методами сбора биообразцов [1]. Одним из основных таких вариантов использования данной технологии является терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ).

На сегодняшний день для проведения ТЛМ и анализа лекарственных препаратов (ЛП) необходим сбор большого количества биологического материала, которым является плазма или сыворотка крови. Для получения данных биообразцов необходимо произвести отбор цельной крови, которую получают стандартными методами венепункции. Однако для многих групп пациентов стандартные методы отбора цельной крови вызывают значительные затруднения, что ограничивает проведение ТЛМ и корректировку режимов дозирования для ЛП с узким терапевтическим диапазоном [1, 2].

Новая технология сбора образцов цельной крови, которым является менее инвазивный и простой способ DBS, позволяет преодолеть существенные ограничения, связанные со стандартными методами и провести ТЛМ в тех клинических ситуациях, в которых он был затруднён или в принципе невозможен [3].

Однако для количественного анализа ЛП в образцах DBS необходимо использование высокочувствительных и селективных аналитических технологий, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС). Использование такой современной аналитической системы позволит оптимизировать анализ биообразцов для проведения ТЛМ и расширить возможности применения DBS на различных стадиях разработки лекарственных средств и в рамках фармакокинетических исследований.

Однако, несмотря на большой потенциал и преимущества этой технологии, её широкое внедрение в рутинную практику ТЛМ станет возможно только после достоверного подтверждения точности и воспроизводимости получаемых аналитических данных о концентрации изучаемых препаратов, что требует дополнительной разработки и валидации биоаналитических методов, использующих метод DBS на этапе взятия биоматериала и его подготовки к исследованию.

ЦЕЛЬ. Разработать протоколы взятия и хранения образцов «высушенной капли крови», а также протоколы валидации методов количественного определения лекарственных препаратов в цельной крови с использованием данной технологии для последующего проведения терапевтического лекарственного мониторинга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа метода DBS и выявления характерных для него особенностей взятия и хранения биообразцов, был проведен сбор и анализ научной литературы за последние 10 лет. Поиск литературных материалов проводился с помощью открытых и доступных источников, размещенных в научных библиотеках учреждений, в электронных базах данных и поисковых системах: Elibrary, PubMed, Scopus, КиберЛенинка, Medline, ScienceDirect, Web of Science, Google Scholar.

Параметрами для отбора литературы были выбраны следующие слова и словосочетания: «высушенная капля крови»; ВЭЖХ-МС; терапевтический лекарственный мониторинг; валидация; пробоподготовка; биоанализ. Также поиск проводился с помощью английских аналогов ключевых слов: Dried Blood Spot; HPLC-MS; therapeutic drug monitoring; validation; sample preparation; bioanalysis.

После анализа литературных данных разрабатывали первичные протоколы взятия, хранения и анализа образцов DBS на основе проведенного детального анализа и выявления специфических характеристик данной методики.

Далее методом ВЭЖХ-МС/МС, используя в качестве пробоподготовки DBS, проводили анализ образцов ивабрадина и оптимизировали протоколы валидации ЛП для достижения приемлемых валидационных характеристик и проведения последующего ТЛМ.

Основное оборудование: ВЭЖХ система Agilent 1260 (Agilent Technologies, Inc., США) с бинарным насосом и термостатируемым автосемплером. Хроматографическое разделение компонентов проводили на колонке Poroshell 120 C18 (4,6 × 50 мм × 2,7 мкм). Аналиты определяли с помощью гибридной масс-спектрометрической системы Sciex QTRAP 5500.

Мобильная фаза представляла собой смесь вода-ацетонитрил, модификатором мобильной фазы служила 0,1% муравьиная кислота, которую добавляли как в водную, так и в органическую мобильную фазы.

В ходе оптимизации условий хроматографического разделения был выбран градиентный режим элюирования. Соотношение мобильной фазы вода-ацетонитрил (70:30) не изменялось при скорости 0,6 мл/мин до 0,5 минуты, после чего происходило постепенное изменение до соотношения вода-ацетонитрил (0:100), которое было достигнуто на 2 мин. На 3 мин. соотношение было изменено на первоначальное, и, при этом, происходило уравнивание системы до 5 мин. Модификатором мобильной фазы служила 0,1% муравьиная кислота, которую добавляли как в водную, так и в органическую составляющую мобильной фазы.

В данной методике для приготовления калибровочных стандартов и образцов контроля качества были использованы стандарты ивабрадина (Servier, Франция) и N-десметиливабрадина в качестве внутреннего стандарта (Toronto Research Chemical Inc., Канада).

Для каждой аналитической серии готовили свежие рабочие растворы стандартов. Конечная концентрация рабочих растворов ивабрадина составила: 10, 20, 100, 500, 1000, 5000, 8000, 10000 нг/мл.

Для получения калибровочного раствора 100 мкл цельной крови переносили в микропробирку на 1,5 мл и добавили 10 мкл рабочего раствора соответствующей концентрации. Концентрация калибровочных растворов составила 1, 2, 10, 50, 100, 500, 800, 1000 нг/мл.

Образцы контроля качества (КК) были приготовлены со следующими четырьмя уровнями концентрации: 1 мкг/мл (нижний предел количественного определения, НПКО), 3 мкг/мл (низкий КК, QCL), 400 мкг/мл (средний КК, QCM) и 750 мкг/мл (высокий КК, QCH).

Далее 20 мкл полученных рабочих растворов наносили на фильтровальную бумагу и давали сохнуть при комнатных условиях в течение 3 часов.

Для подготовки образцов DBS из карт был вырезан диск диаметром 6 мм специальным устройством для выреза маркированных кругов Uni-Core, который помещали в пробирку и экстрагирован экстракционным раствором. Экстракцию проводили с помощью шейкера в течение 20 мин при 25°C, затем образцы переносили в новые пробирки и анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

Статистическая обработка результатов

Обработка полученных данных проводилась с использованием программно-статистической среды R 3.6.1 в программе RStudio 1.2, а также специализированного программного обеспечения Sciex Analyst 1.6.2. Во время работы системы полученные данные обрабатывались в ПО Analyst в виде полных масс-спектров, интенсивности одиночных или множественных ионов в зависимости от времени или общего ионного тока. Для количественного определения использовался метод градуировочного графика с весовым коэффициентом $1/x^2$. В качестве параметра бралось соотношение площадей пика аналита и внутреннего стандарта [8, 10, 12, 23].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общие положения о методе DBS

В отличие от стандартных методов сбора цельной крови, DBS подразумевает сбор минимального

количества капиллярной крови из пальца рук взрослых или пяточки новорожденных детей и нанесении капли крови на отмеченную область фильтровальной бумаги. После данной процедуры капля крови сохнет на воздухе при комнатной температуре в течение не менее 4-х часов в сухом месте без попадания прямых солнечных лучей. Высушенные образцы транспортируются в лабораторию, в которой производят манипуляции, связанные с вырезом диска от 3 до 8 мм из фильтровальной карты специальным устройством. Этот диск в последствие экстрагируется органическим растворителем или смесью водного и органического растворителя. Далее полученные образцы количественно определяются с помощью различных биоаналитических технологий [4].

Таким образом, весь процесс сбора образцов DBS рассматривается как распределение капли крови по пористой поверхности с одновременным проникновением и растеканием внутри неё. Распределение и смачивание пор субстрата кровью является комплексным процессом, зависящим от физических и химических свойств (бумаги и крови), что необходимо дополнительно исследовать перед применением в широкой клинической практике [4].

Весь этот механизм метода DBS определяет ряд существенных преимуществ данной технологии перед стандартными способами сбора биоматериала, а также некоторые его ограничения.

Преимущества и недостатки технологии DBS

Одно из основных преимуществ данной технологии – отбор достаточно меньшего количества цельной крови, что позволяет преодолеть существующие ограничения ТЛМ для различных групп пациентов. Также метод DBS подразумевает процесс сушки образцов в стандартных лабораторных условиях и их транспортировку в аналитическую лабораторию без использования специального оборудования и с минимальным риском инфекционного заражения [3, 5].

Существует возможность проводить процедуру взятия биоматериала дома без привлечения специального персонала. Это позволит производить большее количество анализов с помощью метода DBS и построить более точную кривую зависимости «концентрация-время» для оптимизации режима дозирования ЛП с узким терапевтическим диапазоном.

Все вышеперечисленные преимущества могут иметь существенные экономические выгоды при сборе и анализе образцов DBS по сравнению со стандартными методами сбора биообразцов. Возможный отбор проб DBS на дому также приведет к существенным экономическим выгодам у пациентов, которым требуется провести ТЛМ [7].

Однако данный метод не лишён своих недостатков. Анализ образцов DBS подразумевает специальное высокочувствительное аналитическое оборудование и необходимость обучения медицинских работников для получения образцов надлежащего качества [8, 9]. Также стоит принять во внимание, что используемые в настоящее время требования к валидации биоаналитических методик, которые описаны в руководствах для традиционных матриц, не обеспечивают всех необходимых аспектов разработки метода, аналитической и клинической валидации для образцов DBS и применения их в рамках ТЛМ. Такие специфические параметры, характерные для новой технологии, как: влияние гематокрита, которое может привести к различной вязкости крови и распределению капли на бумаге; гомогенность капли и её размер могут повлиять на получаемый результат и в свою очередь требуют дополнительной валидации [10, 11].

Все эти недостатки создают необходимость разработки новых протоколов взятия и хранения образцов крови, а также дополнительной валидации, которые были бы характерны для метода DBS и использования его в ТЛМ.

Анализ существующих литературных источников

За последние 10 лет было опубликовано большое количество статей, описывающих разработку, валидацию нового метода DBS, а также возможность применения его в рамках проведения ТЛМ различных классов препаратов, таких как: анальгетики, антибиотики, противоэпилептические, антидепрессанты, противомаларийные, противогрибковые, антиретровирусные, мочегонные, иммунодепрессанты и др. [12].

Нами был произведен анализ существующих способов количественного определения ЛП с помощью ВЭЖХ-МС/МС в образцах «высушенной капли крови» (табл. 1). В выбранных работах учитывались дополнительные валидационные характеристики, присущие только для нового способа сбора биообразцов, оказывающих значительное влияние на результаты анализа: размер капли, природа материала, карта для образцов DBS, условия экстракции и уровень гематокрита [9, 10, 13, 15, 16, 18–20, 25–29].

Такие параметры, как эффект гематокрита, эффект объёма капли и однородность пятна могут оказывать существенное влияние на результат анализа ЛП в образцах DBS и могут варьироваться от образца к образцу. Именно эти характеристики и были определены как дополнительные параметры, требующие разработки новых протоколов валидации количественного ВЭЖХ-МС/МС анализа

лекарственных препаратов, а также подготовки практических рекомендаций для медицинских работников по сбору и хранению данных образцов цельной крови для получения приемлемых аналитических результатов [8, 9, 17, 39].

Разработка протоколов отбора, хранения образцов и валидации DBS

На основании литературного анализа и существующих методик сбора капель цельной крови на специальную бумагу, нами были разработаны и оптимизированы протоколы взятия образцов DBS из пальца руки для взрослых пациентов и из пятки для новорожденных детей [40–42]. Разработанные протоколы представлены ниже.

Протокол взятия и хранения образцов DBS из пятки новорожденных детей:

1. Оформить информированное добровольное согласие законного представителя;
2. Подписать капли с идентификатором пациента и датой;
3. Выбрать место проведения пункции на боковой стороне пятки;
4. Разогреть стопу с помощью теплой пленки;
5. Обработать руки и надеть стерильные перчатки;
6. Расположить пятку ниже туловища ребенка и удерживать ее без резкого сгибания лодыжки;
7. Обработать место проведения пункции с помощью антисептического раствора и дать ему высохнуть;
8. Быстро проколоть кожу латерально, в месте, как показано на картинке (Рис. 1), с помощью ланцета и стереть стерильным ватным шариком первую каплю крови.
9. Удерживать место пункции внизу, осторожно надавливая на прилегающую область и произвести взятие крови на бланк на фильтровальную бумагу;
10. Держать карту, не касаясь отмеченной области (Рис. 2);
11. Осторожно прикоснувшись карточкой фильтровальной бумаги к капле крови, нанести её на карту. Дать карточке впитать кровь, пока круг не заполнится. После нанесения не прикасаться к отмеченной области;
12. Дать пятну крови высохнуть в темном месте. Исключить попадание прямых солнечных лучей в течение не менее 4-х часов. Не нагревать и не допускать контакта образцов высушенной капли с другими поверхностями во время процесса сушки;
13. Запечатать карту (или части карты) в газонепроницаемом пакете с застежкой-молнией. Хранить не более одной карты в упаковке в холодильнике до отправки в лабораторию при 2–8°C.

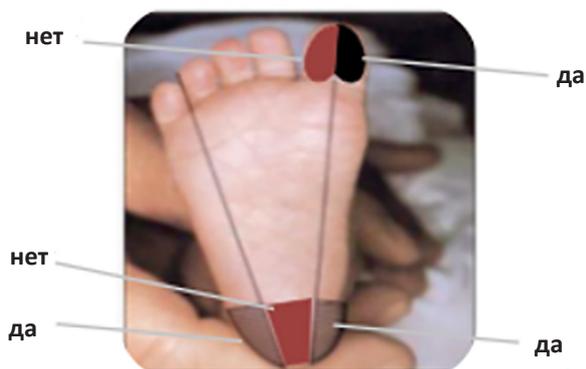


Рисунок 1 – Место прокола пятки новорожденных



Рисунок 2 – Пример карты для DBS

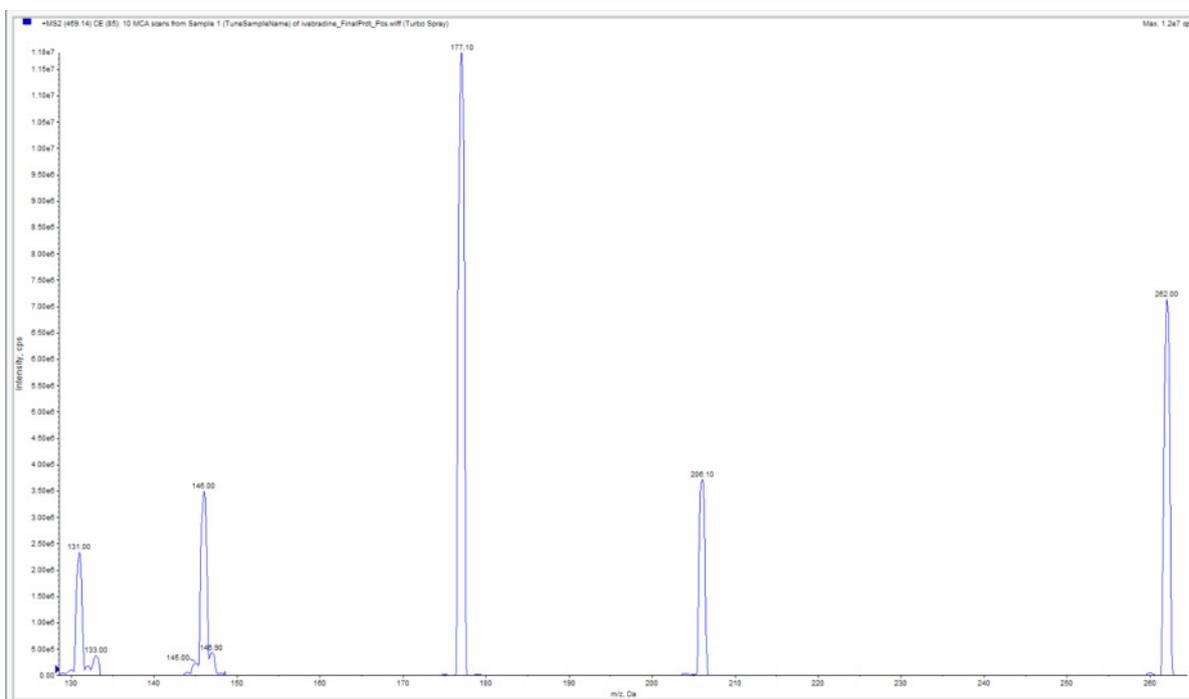


Рисунок 3 – Масс-спектр ивабрадина в плазме крови

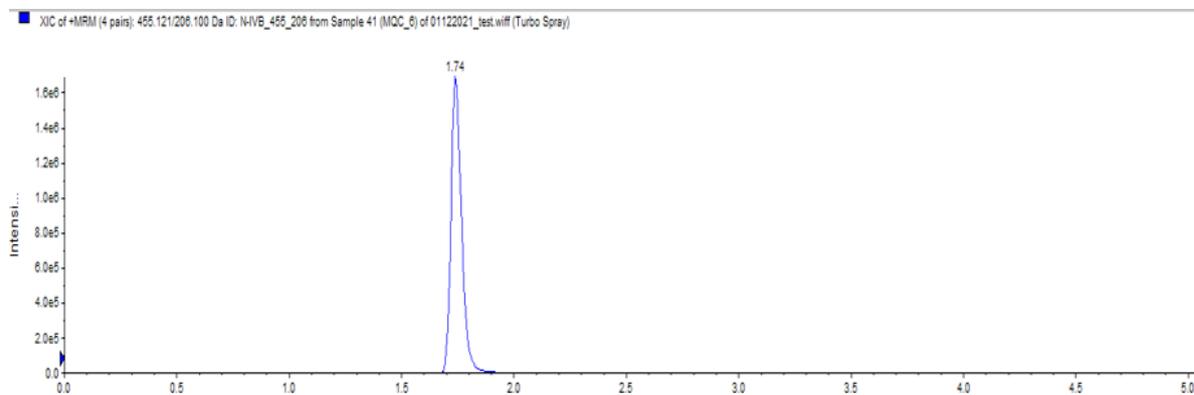


Рисунок 4 – Хромато-масс-спектрограмма ивабрадина в плазме крови

Примечание: по оси абсцисс – время (мин), по оси ординат – интенсивность сигнала.

Таблица 1 – Дополнительные валидационные параметры для анализа лекарственных препаратов с помощью ВЭЖХ-МС/МС

ЛП	Класс ЛП	Дополнительная DBS валидация	Ссылки
Флуконазол	Противогрибковые	Эффект объема капли	[32, 33]
Микофеноловая кислота	Противоопухолевое	–	[15, 19, 20]
Метотрексат	Противоопухолевый	Эффект гематокрита	[18]
Вориконазол	Противогрибковые	Эффект объема капли	[14, 15]
Моксифлоксацин	Антибиотик	Эффект объема капли, тип бумаги	[14, 21]
Пипирециллин	Антибиотик	–	[18, 20]
Сиролимус	Иммунодепрессант	Гомогенность, эффект гематокрита, эффект объема капли	[22–26]
Эверолимус	Иммунодепрессант	Гомогенность, эффект гематокрита, объема капли	[24-26, 28, 37, 38]
Тазобактам	Антибиотик	–	[16, 31]
Ванкомицин	Антибиотик	Гомогенность, эффект гематокрита, эффект объема капли	[16, 17]
Такролимус	Иммунодепрессант	Гомогенность, эффект гематокрита, эффект объема капли	[22–30]
Циклоспорин А	Иммунодепрессант	Гомогенность, эффект гематокрита, эффект объема капли	[26, 30, 34-36, 43]

Таблица 2 – Стандартные параметры валидации

Валидационный параметр	Проводимые испытания	Критерии приемлемости [8, 10]
Линейность	8 калибровочных образцов + холостая проба + нулевая проба	≤ 15% от номинальных значений (≤ 20% для НПКО), не менее чем для 75% образцов
Селективность	6 холостых образцов и 6 НПКО	≤ 20% от НПКО
Правильность	5 образцов КК на 4-х концентрационных уровнях	≤ 15% (≤ 20% для НПКО)
Прецизионность	5 образцов КК на 4-х концентрационных уровнях	≤ 15% (≤ 20% для НПКО)
Матричный эффект	5 образцов КК на 2-х концентрационных уровнях при 3-х разных значениях гематокрита	≤ 15%
Стабильность	5 образцов КК на 2-х уровнях концентрации при комнатной температуре в трех временных точках через 2 часа после нанесения капли, через 7 и 14 дней.	≤ 15%

Примечание: КК – образцы контроля качества; НПКО – нижний предел количественного определения.

Таблица 3 – Специфические параметры валидации

Валидационный параметр	Проводимые испытания	Критерии приемлемости [8, 10]
Эффект объема капли	5 образцов КК на 3-х значениях объема капли (10, 40, 70 мкл) при 3-х уровнях гематокрита (0,3; 0,4; 0,5), на 2-х уровнях концентрации	≤ 15% от номинальных значений
Эффект гематокрита	5 образцов КК для 3-х уровней гематокрита, при 2 концентрационных уровнях	≤ 15% от номинальных значений
Однородность капли	Сравниваются 5 образцов КК на 2-х уровнях концентраций образцов КК при 3-х уровнях гематокрита, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и у края.	≤ 15% от номинальных значений

Примечание: КК – образцы контроля качества.

Таблица 4 – Валидационные параметры методики пробоподготовки «высушенной капли крови»

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

Таблица 5 – Влияние гематокрита на результаты анализа

Гематокрит %	КК	Номинальная концентрация (нг/мл)	Точность (%)
0,3	QCL	3	113,7
	QCH	750	109,6
0,4	QCL	3	99,4
	QCH	750	105,1
0,5	QCL	3	95,5
	QCH	750	94,7

Протокол взятия и хранения образцов DBS из пальца руки:

1. Оформить информированное добровольное согласие законного представителя;
2. Подписать капли с идентификатором пациента и датой;
3. Выбрать место проведения пункции на указательном пальце;
4. Флеботамисту необходимо обработать руки и надеть стерильные перчатки;
5. Обработать место проведения пункции с помощью антисептического раствора и дать ему высохнуть;
6. Быстро проколоть кожу с помощью ланцета и стереть стерильным ватным шариком первую каплю крови;
7. Удерживать место пункции внизу, осторожно надавливая на прилегающую область и произвести взятие крови на бланк фильтровальной бумаги;
8. Держать карту, не касаясь отмеченной области;
9. Осторожно прикоснувшись карточкой фильтровальной бумаги к капле крови, нанести её на карту. Дать карточке впитать кровь, пока круг не заполнится. После нанесения не прикасаться к отмеченной области;
10. Дать пятну крови высохнуть в темном месте. Исключить попадание прямых солнечных лучей в течение не менее 4-х часов. Не нагревать и не допускать контакта образцов высушенной капли с другими поверхностями во время процесса сушки;
11. Запечатать карту (или части карты) в газонепроницаемом пакете с застежкой-молнией. Хранить не более одной карты в упаковке в холодильнике до отправки в лабораторию при

2–8°C. При этом, все полученные образцы на фильтровальной бумаге должны быть равномерно распределены на отмеченной области и капли не должны сливаться друг с другом. В случае получения неполного распределения крови в отмеченной области или слияния двух капель, такие образцы считают неприемлемыми и не используются для дальнейшего анализа.

Протоколы валидации количественных ВЭЖХ-МС/МС методов анализа

На сегодняшний день такие организации, как International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology и Food and Drug Administration (FDA) работают над созданием общих руководств по валидации технологии DBS, описывая не только валидационные параметры, характерные для стандартных способов пробоподготовки и традиционных матриц, но и специфические параметры, присущие только для этой новой технологии [10, 11, 45–48, 50].

Из анализа существующих методик количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ЛП с использованием данного метода пробоподготовки, нами были разработаны новые протоколы валидации с использованием стандартных (табл. 2) и специфических параметров валидации метода DBS (табл. 3).

При разработке методики количественного определения ивабрадина в образцах DBS были найдены ионы-«предшественники» ивабрадина, которые соответствовали частицам с m/z 469. Для построения метода мониторинга множественных реакций (MRM) использовались ионные переходы,

соответствующие наибольшей интенсивности ионов-«продуктов». Было установлено, что в ходе диссоциации в камере соударений наиболее интенсивны ионы-«продукты» составили: m/z 262,2 и 177,1 m/z (Рис. 3).

При хроматографическом определении в оптимизированных условиях время удерживания ивабрадина в плазме крови составило – 1,74 мин (Рис. 4).

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

Нижний предел количественного определения методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация ивабрадина в образцах DBS в аналитическом диапазоне, для которого возможно количественное определение ивабрадина со значениями относительного стандартного отклонения не более 20%. Нижний предел количественного определения методики составил 1 нг/мл (табл. 4).

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

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

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

При валидации однородности капли сравнили результаты образцов КК при QCL и QCH, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и с края. Анализ проводился в 5 сериях. При этом относительная погрешность при сравнении

концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не превышала 15% от номинальных.

Для оценки стабильности использовали образцы DBS на уровнях QCL и QCH при этом образцы проанализированы в трех временных точках 1, 7 и 14 дней вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивались со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов контроля качества. При этом полученные значения после 14 дней хранения находились в диапазоне от 87,2–93,8%.

Термическая стабильность была оценена при хранении образцов DBS в течение 14 дней при температуре 22°C и 45°C, как потенциально возможные температуры при хранении и транспортировке образцов.

Разработанные протоколы оказались пригодными для проведения валидации метода количественного определения ивабрадина и является приемлемыми для дальнейшего использования в исследовательских работах и проведения ТЛМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить, что метод «высушенной капли крови» является новейшим методом отбора биологических образцов, обладающий рядом существенных преимуществ перед стандартными методами.

При использовании оптимизированной пробоподготовки и разработанные нами новые протоколы взятия, хранения, валидации и методы количественного анализа образцов DBS технология имеет широкое применение в доклинических и клинических исследованиях, терапевтическом и токсикологическом мониторинге лекарственных средств, а также в крупных эпидемиологических исследованиях. При этом данная технология может представлять более экономически-эффективную модель анализа лекарственных средств, а также обеспечить столь необходимые фармакокинетические результаты достаточно эффективным и надежным способом.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

И.С. Аникеев, Т.Е. Заячникова, А.М. Доценко – концепция исследования, планирование статьи, обзор литературных источников, сбор материалов, написание и редактирование статьи;
В.И. Петров, А.В. Стрыгин – разработка дизайна исследования, редактирование и окончательное утверждение статьи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Абаимов Д.А., Сариев А.К., Носкова Т.Ю., Шведков В.В., Ширяева М.В., Стырова Е.Ю., Прохоров Д.И., Сейфулла Р.Д. Современные технологии в терапевтическом лекарственном мониторинге // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2013. – Т. 5, № 2. – С. 31–41.
2. Déglon J., Thomas A., Mangin P., Staub C. Direct analysis of dried blood spots coupled with mass spectrometry: concepts and biomedical applications // Anal. Bioanal. Chem. – 2012. – Vol. 402, No. 8. – P. 2485–2498. DOI: 10.1007/s00216-011-5161-6
3. Demirev P.A. Dried blood spots: analysis and applications // Anal. Chem. – 2013. – Vol. 85, No. 2. – P. 779–789. DOI: 10.1021/ac303205m
4. Edelbroek P.M., van der Heijden J., Stolk L.M. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls // Ther. Drug. Monit. – 2009. – Vol. 31, No. 3. – P. 327–336. DOI: 10.1097/FTD.0b013e31819e91ce.
5. Antunes M.V., Charão M.F., Linden R. Dried blood spots analysis with mass spectrometry: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring // Clin. Biochem. – 2016. – Vol. 49, No. 13–14. – P. 1035–1046. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2016.05.004
6. Amsterdam P.V., Waldrop C. The application of dried blood spot sampling in global clinical trials // Bioanalysis. – 2010. – Vol. 2, No. 11. – P. 1783–1786. DOI: 10.4155/bio.10.158
7. Jimmerson L.C., Zheng J.H., Bushman L.R., MacBrayne C.E., Anderson P.L., Kiser J.J. Development and validation of a dried blood spot assay for the quantification of ribavirin using liquid chromatography coupled to mass spectrometry // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2014. – Vol. 944. – P. 18–24. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.10.035
8. Timmerman P., White S., Globig S., Lütke S., Brunet L., Smeraglia J. EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots // Bioanalysis. – 2011. – Vol. 3, No. 14. – P. 1567–1575. DOI: 10.4155/bio.11.132
9. Jager N.G., Rosing H., Schellens J.H., Beijnen J.H. Procedures and practices for the validation of bioanalytical methods using dried blood spots: a review // Bioanalysis. – 2014. – Vol. 6, No. 18. – P. 2481–2514. DOI: 10.4155/bio.14.185
10. Capiou S., Veenhof H., Koster R.A., Bergqvist Y., Boettcher M., Halmingh O., Keevil B.G., Koch B.C.P., Linden R., Pistos C., Stolk L.M., Touw D.J., Stove C.P., Alffenaar J.C. Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot-Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring // Ther. Drug. Monit. – 2019. – Vol. 41, No. 4. – P. 409–430. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000643
11. Martial L.C., Aarnoutse R.E., Schreuder M.F., Henriët S.S., Brüggemann R.J., Joore M.A. Cost Evaluation of Dried Blood Spot Home Sampling as Compared to Conventional Sampling for Therapeutic Drug Monitoring in Children // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, No. 12. – e0167433. DOI: 10.1371/journal.pone.0167433
12. Barfield M. The Application of Dried Blood Spots in Toxicokinetic and Pharmacokinetic Studies. Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements of the University of Lincoln, 2017. – 188 p.
13. Vu D.H., Koster R.A., Alffenaar J.W., Brouwers J.R., Uges D.R. Determination of moxifloxacin in dried blood spots using LC-MS/MS and the impact of the hematocrit and blood volume // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2011. – Vol. 879, No. 15–16. – P. 1063–1070. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.03.017
14. Arpini J., Antunes M.V., Pacheco L.S., Gnatta D., Rodrigues M.F., Keitel E., Linden R. Clinical evaluation of a dried blood spot method for determination of mycophenolic acid in renal transplant patients // Clin. Biochem. – 2013. – Vol. 46, No. 18. – P. 1905–1908. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.10.011.
15. Barco S., Risso F.M., Bruschettoni M., Bandettini R., Ramenghi L.A., Tripodi G., Castagnola E., Cangemi G. A validated LC-MS/MS method for the quantification of piperacillin/tazobactam on dried blood spot // Bioanalysis. – 2014. – Vol. 6, No. 21. – P. 2795–2802. DOI: 10.4155/bio.14.205.
16. Al-Ghazawi M., Khaled Daoud Noor E.H., Hadidi K., Alzweiri M., Aburuz S. Determination of vancomycin content in dried blood spots for therapeutic drug monitoring // Acta Poloniae Pharmaceutica. – 2021. – Vol. 78, No. 1. P. 3–10. DOI:10.32383/appdr/132021
17. Hawwa A.F., Albawab A., Rooney M., Wedderburn L.R., Beresford M.W., McElroy J.C. A novel dried blood spot-LCMS method for the quantification of methotrexate polyglutamates as a potential marker for methotrexate use in children // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, No. 2. – e89908. DOI: 10.1371/journal.pone.0089908
18. Wilhelm A.J., den Burger J.C., Chahbouni A., Vos R.M., Sinjewel A. Analysis of mycophenolic acid in dried blood spots using reversed phase high performance liquid chromatography // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2009. – Vol. 877, No. 30. – P. 3916–3919. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.09.037
19. Heinig K., Bucheli F., Hartenbach R., Gajate-Perez A. Determination of mycophenolic acid and its phenyl glucuronide in human plasma, ultrafiltrate, blood, DBS and dried plasma spots // Bioanalysis. – 2010. – Vol. 2, No. 8. – P. 1423–1435. DOI: 10.4155/bio.10.99
20. Scribel L., Zavascki A.P., Matos D., Silveira F., Peralta T., Gonçalves Landgraf N., Lamb Wink P., Cezimbra da Silva A.C., Bordin Andriqueti N., Loss Lisboa L., Venzon Antunes M., Linden R. Vancomycin and creatinine determination in dried blood spots: Analytical validation and clinical assessment // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2020. – Vol. 1137. – Art. ID: 121897. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.121897.
21. Koster R.A., Alffenaar J.W., Greijdanus B., Uges D.R. Fast LC-MS/MS analysis of tacrolimus, sirolimus, everolimus and cyclosporin A in dried blood spots and the influence of the hematocrit and immunosuppressant concentration on recovery // Talanta. – 2013. – Vol. 115. – P. 47–54. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.04.027
22. Sadiilkova K., Busby B., Dickerson J.A., Rutledge J.C., Jack R.M. Clinical validation and implementation of a multiplexed immunosuppressant assay in dried blood spots by LC-MS/MS // Clin. Chim. Acta. – 2013. – Vol. 421. – P. 152–156. DOI: 10.1016/j.cca.2013.02.009
23. Li Q., Cao D., Huang Y., Xu H., Yu C., Li Z. Development and validation of a sensitive LC-MS/MS method for determination of tacrolimus on dried blood spots // Biomed. Chromatogr. – 2013. – Vol. 27, No. 3. – P. 327–334. DOI: 10.1002/bmc.2795
24. Egas A.C., Van Maarseveen E.M., Kwakkel-Van Erp J.M. Rapid and combined measurement of cyclosporin a, tacrolimus, sirolimus and everolimus in whole blood and dried blood spot with LC-MS/MS // J. Heart. Lung. Transplant. – 2014. – Vol. 33 (Issue 4). – S68. DOI: 10.1016/j.healun.2014.01.217

25. Koop D.R., Bleyle L.A., Munar M., Cherala G., Al-Uzri A. Analysis of tacrolimus and creatinine from a single dried blood spot using liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2013. – Vol. 926. – P. 54–61. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.02.035
26. Shokati T., Bodenberger N., Gadpaille H., Schniedewind B., Vinks A.A., Jiang W., Alloway R.R., Christians U. Quantification of the Immunosuppressant Tacrolimus on Dried Blood Spots Using LC-MS/MS // *J. Vis. Exp.* – 2015. – No. 105. – e52424. DOI: 10.3791/52424
27. Zwart T.C., Gokoel S.R.M., van der Boog P.J.M., de Fijter J.W., Kweekel D.M., Swen J.J., Guchelaar H.J., Moes D.J.A.R. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus and mycophenolic acid in outpatient renal transplant recipients using a volumetric dried blood spot sampling device // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 84, No. 12. – P. 2889–2902. DOI: 10.1111/bcp.13755
28. Hinchliffe E., Adaway J., Fildes J., Rowan A., Keevil B.G. Therapeutic drug monitoring of ciclosporin A and tacrolimus in heart lung transplant patients using dried blood spots // *Ann. Clin. Biochem.* – 2014. – Vol. 51(Pt 1). – P. 106–109. DOI: 10.1177/0004563213488759
29. Cohen-Wolkowicz M., Watt K.M., Zhou C., Bloom B.T., Poindexter B., Castro L., Gao J., Capparelli E.V., Benjamin D.K. Jr., Smith P.B. Developmental pharmacokinetics of piperacillin and tazobactam using plasma and dried blood spots from infants // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2014. – Vol. 58, No. 5. – P. 2856–2865. DOI: 10.1128/AAC.02139-13
30. van der Elst K.C., Span L.F., van Hateren K., Vermeulen K.M., van der Werf T.S., Greijdanus B., Kosterink J.G., Uges D.R., Alffenaar J.W. Dried blood spot analysis suitable for therapeutic drug monitoring of voriconazole, fluconazole, and Posaconazole // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2013. – Vol. 57, No. 10. – P. 4999–5004. DOI: 10.1128/AAC.00707-13
31. Wilhelm A.J., den Burger J.C., Vos R.M., Chahbouni A., Sinjewel A. Analysis of cyclosporin A in dried blood spots using liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2009. – Vol. 877, No. 14–15. – P. 1595–1598. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.03.024
32. Wilhelm A.J., Klijn A., den Burger J.C., Visser O.J., Veldkamp A.I., Janssen J.J., Swart E.L. Clinical validation of dried blood spot sampling in therapeutic drug monitoring of ciclosporin A in allogeneic stem cell transplant recipients: direct comparison between capillary and venous sampling // *Ther. Drug. Monit.* – 2013. – Vol. 35, No. 1. – P. 92–95. DOI: 10.1097/FTD.0b013e31827d76ce
33. Hinchliffe E., Adaway J.E., Keevil B.G. Simultaneous measurement of cyclosporin A and tacrolimus from dried bloodspots by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2012. – Vol. 883–884. – P. 102–107. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.05.016
34. Antunes M.V., Charão M.F., Linden R. Dried blood spots analysis with mass spectrometry: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring // *Clin. Biochem.* – 2016. – Vol. 49, No. 13–14. – P. 1035–1046. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2016.05.004
35. Hoffman J.T., Rossi S.S., Espina-Quinto R., Letendre S., Capparelli E.V. Determination of efavirenz in human dried blood spots by reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection // *Ther. Drug. Monit.* – 2013. – Vol. 35, No. 2. – P. 203–208. DOI: 10.1097/FTD.0b013e31827fb72b
36. Li W., Lee M.S. *Dried Blood Spots: Applications and Techniques.* Wiley. – 2014. – 376 p.
37. Chermont A.G., Falcão L.F., de Souza Silva E.H., de Cássia Xavier Balda R., Guinsburg R. Skin-to-skin contact and/or oral 25% dextrose for procedural pain relief for term newborn infants // *Pediatrics.* – 2009. – Vol. 124, No. 6. – P. 1101–1107. DOI: 10.1542/peds.2009-0993
38. Hummel P., Puchalski M., Creech S.D., Weiss M.G. Clinical reliability and validity of the N-PASS: neonatal pain, agitation and sedation scale with prolonged pain // *J. Perinatol.* – 2008. – Vol. 28, No. 1. – P. 55–60. DOI: 10.1038/sj.jp.7211861
39. Киреев С.С. Боль и стресс у новорожденных (обзор литературы) // *Вестник новых медицинских технологий.* – 2016 – Т. 23, № 4. – С. 328–342. DOI: 10.12737/issn.1609-2163
40. Streit F., William Armstrong V., Oellerich M. Rapid Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Routine Method for Simultaneous Determination of Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus, and Cyclosporin A in Whole Blood // *Clinical Chemistry.* – 2002. – Vol. 48 (Issue 6). – P. 955–958. DOI: 10.1093/clinchem/48.6.955
41. Tsao J.C., Evans S., Meldrum M., Altman T., Zeltzer L.K. A Review of CAM for Procedural Pain in Infancy: Part I. Sucrose and Non-nutritive Sucking // *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* – 2008. – Vol. 5, No. 4. – P. 371–381. DOI: 10.1093/ecam/nem084
42. Freeman J.D., Rosman L.M., Ratcliff J.D., Strickland P.T., Graham D.R., Silbergeld E.K. State of the Science in Dried Blood Spots // *Clin. Chem.* – 2018. – Vol. 64, No. 4. – P. 656–679. DOI: 10.1373/clinchem.2017.275966
43. Zakaria R., Allen K.J., Koplin J.J., Roche P., Greaves R.F. Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process // *EJIFCC.* – 2016. – Vol. 27, No. 4. – P. 288–317.
44. Linder C. Possibilities of Dried Blood Spots As a Matrix in Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs in Children. Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. 2019. – 61 p.
45. Murphy S.C., Daza G., Chang M., Coombs R. Laser cutting eliminates nucleic acid cross-contamination in dried-blood-spot processing // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol. 50, No. 12. – P. 4128–4130. DOI: 10.1128/JCM.02549-12
46. Li Y., Henion J., Abbott R., Wang P. Dried blood spots as a sampling technique for the quantitative determination of guanfacine in clinical studies // *Bioanalysis.* – 2011. – Vol. 3, No. 22. – P. 2501–2514. DOI: 10.4155/bio.11.262
47. Klak A., Pauwels S., Vermeersch P. Preanalytical considerations in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants with dried blood spots // *Diagnosis (Berl).* – 2019. – Vol. 6, No. 1. – P. 57–68. DOI: 10.1515/dx-2018-0034
48. Knapen L.M., Beera Y., Brüggemann R.M., Stolkab L.M., Vries F., Vivianne C.G., et al. Development and validation of an analytical method using UPLC–MS/MS to quantify everolimus in dried blood spots in the oncology setting // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2018. – Vol. 149. – P. 106–113. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.10.039
49. Börsch-Supan A., Börsch-Supan M., Weiss L.M. Dried blood spot samples and their validation // *Health and socio-economic status over the life course.* – 2019. – P. 349–358. DOI: 10.1515/9783110617245-036

АВТОРЫ

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

Аникеев Иван Сергеевич – аспирант кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; заведующий лабораторией фармакокинетики НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-9384-4338. E-mail: anikeivan@yandex.ru

Заячникова Татьяна Евгеньевна – кандидат медицинских наук, доцент, профессор кафедры

педиатрии и неонатологии Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-6758-4686. E-mail: guz5deti@mail.ru

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

Доценко Анна Михайловна – ассистент кафедры фундаментальной медицины и биологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; младший научный сотрудник лаборатории геномных и протеомных исследований ГБУ ВМНЦ. ORCID ID: 0000-0003-3324-3351. E-mail: ev8278@mail.ru