

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР ИМЕНИ В.А. АЛМАЗОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**БЕЗВУЛЯК  
ЕКАТЕРИНА ИГОРЕВНА**

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

**3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор,  
Заслуженный деятель науки РФ  
Вавилова Татьяна Владимировна**

Санкт-Петербург – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### **Клинико-лабораторные особенности терапевтического лекарственного мониторинга иммуносупрессивной терапии у пациентов после трансплантации сердца 15**

1.1 Трансплантация сердца – высокотехнологичный метод лечения терминальной стадии декомпенсированной сердечной недостаточности 15

1.2 Иммуносупрессивная терапия у реципиентов трансплантированного сердца 20

1.3 Эверолимус в структуре иммуносупрессивной терапии у реципиентов трансплантированного сердца 23

1.4 Химическая характеристика и фармакокинетика эверолимуса 26

1.5 Побочные эффекты эверолимуса 27

1.6 Лабораторные методы терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса 31

1.6.1 Иммунохимический метод 34

1.6.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием 36

### **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 39**

2.1 Дизайн исследования 39

2.2 Общая характеристика реципиентов 40

2.3 Методы обследования пациентов 44

2.3.1 Эндомиокардиальная биопсия 45

2.3.2 Коронарографическое исследование 46

2.3.3 Лабораторные исследования 46

2.4 Лабораторные методы измерения концентрации эверолимуса в пробах цельной крови пациентов исследуемой группы 47

2.5 Статистические и математические методы 53

**55**

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

- 3.1 Результаты валидации модифицированной аналитической методики количественного определения эверолимуса в образцах цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием 55
- 3.2 Сравнительная оценка лабораторной информативности иммунохимического метода и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием при верификации осложнений иммуносупрессивной терапии эверолимусом у пациентов после трансплантации сердца 64
- 3.3 Результаты сравнительной оценки клинической информативности иммунохимического метода и ВЭЖХ-МС/МС при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца 68
- 3.3.1 Сравнительный анализ развития острого клеточного и антителоопосредованного отторжения сердечного трансплантата при проведении терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС 68
- 3.3.2 Сравнительная оценка прогрессирования болезни коронарных артерий пересаженного сердца при проведении терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и методом ВЭЖХ-МС/МС 74
- 3.3.3 Сравнительный анализ развития инфекционных осложнений у реципиентов сердца, принимающих эверолимус при проведении терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и методом ВЭЖХ-МС/МС 76
- 3.3.4 Анализ развития дислипидемии в исследуемых группах 77
- 3.3.5 Сравнительная оценка показателей гемограммы у пациентов исследуемой группы при проведении терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС 79

<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ</b>	<b>82</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>87</b>
<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>88</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b>	<b>89</b>
<b>ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ</b>	<b>90</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	<b>91</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>93</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b>	<b>112</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность 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 корректировке дозы или кратности приема препарата на основании полученных данных [43].

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 [12, 53]. 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 [40]. Количество пациентов в России, ожидающих трансплантацию сердца, увеличилось за последнее десятилетие в 2 раза и составило в 2019 г. 789 потенциальных реципиентов [12].

С учетом научных достижений в вопросах трансплантации сердца медиана выживаемости пациентов составляет на сегодняшний день 14 лет [11]. Одним из лимитирующих факторов, оказывающих влияние на клинический исход у пациентов после пересадки сердца, выступает отторжение трансплантированного органа [51, 24, 8, 11, 20]. По данным литературы, отторжение трансплантированного сердца является одной из лидирующих причин смерти пациентов в первые три года после пересадки сердца [46]. Максимальный риск отторжения трансплантированного сердца наблюдается в первые несколько месяцев после пересадки и сохраняется в течение всей жизни реципиента, постепенно снижаясь, что требует проведения иммуносупрессивной терапии на протяжении всей жизни [24].

Иммуносупрессивное лечение, которое получают пациенты с трансплантированным сердцем, состоит из индукционной схемы, проводимой в периоперационном и раннем послеоперационном периоде препаратами с выраженным иммуносупрессивным эффектом с целью профилактики острого и сверхострого отторжения, и поддерживающей схемы. Поддерживающая схема представляет собой сочетание иммунодепрессантов, обладающих разными механизмами действия (глюкокортикоиды, ингибиторы кальциневрина, микофенолата мофетил, ингибиторы пролиферативного сигнала) [23, 20]. Все группы препаратов обладают индивидуальными фармакокинетическими и фармакодинамическими особенностями, эффективностью, побочными эффектами.

Одним из лекарственных средств, рекомендованных к применению у пациентов, перенесших пересадку сердца для профилактики отторжения трансплантата, является ингибитор пролиферативного сигнала эверолимус [20]. Эверолимус характеризуется рядом благоприятных клинических эффектов: 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 [52, 84, 68, 122].

Эверолимус обладает узким терапевтическим диапазоном и выраженной межиндивидуальной вариабельностью фармакокинетических параметров, что требует проведения терапевтического лекарственного мониторинга во время терапии с целью достижения эффективности препарата и профилактики токсических проявлений (кашель, гипертриглицеридемия, гиперхолестеринемия, стоматит, одышка, диарея, слабость, артериальная гипертензия, осложнения заживления ран, интерстициальный пневмонит, гематологические заболевания, периферические отеки) [32, 118, 134].

Для количественного определения эверолимуса в крови лабораторная медицина предлагает два метода исследования: иммунохимический анализ и высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием [118, 134, 64].

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 [29, 13]. Такая природа метода обуславливает получение положительного сигнала при наличии в смеси похожих на искомый аналит молекул [118, 64].

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 [16]. 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 [36]. Кроме того, единичное исследование методом ВЭЖХ-МС/МС значительно дешевле использования дорогостоящих тест-систем для иммунохимического анализатора.

Существует проблема несопоставимости результатов между двумя методами [83, 131, 135], однако вопрос выбора метода для выполнения мониторинга концентраций эверолимуса у пациентов после пересадки сердца 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 [118, 131, 68, 80, 124]. Их работы в значительной мере содержат подробное объяснение механизма действия эверолимуса [96, 115] и обоснование применения препарата у пациентов после трансплантации печени и почек [110, 92, 124]. Кроме того, рассматриваются важные особенности терапии эверолимусом, а именно необходимость тщательного и индивидуального подбора дозы [131], демонстрируются наиболее часто встречающиеся побочные эффекты эверолимуса [60], отражается зависимость токсических проявлений и эффективности терапии от дозы и концентрации, демонстрируются факторы, оказывающие влияние на фармакокинетические параметры [131, 60], обосновывается необходимость проведения терапевтического лекарственного мониторинга препарата в крови, рекомендуется целевой терапевтический интервал концентраций (3-8 нг/мл) [118, 131].

Терапевтический лекарственный мониторинг, как таковой, рассматриваются в ряде научных работ [43, 108, 66, 128]. 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 [44, 114].

Отдельные работы посвящены аналитическому этапу терапевтического лекарственного мониторинга и используемым лабораторным методам, в которых рассматриваются основные преимущества и недостатки различных лабораторных систем [134, 118]. Сравнительные исследования иммунохимического и хроматографического методов не проводились, хотя отражался факт несопоставимости результатов исследований [83, 131, 135].

### **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

### **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.

### **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 клинико-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.

### **Степень достоверности и апробация 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 [130]. Исследование проведено на достаточном количестве образцов цельной крови, требуемом для

оценки аналитического смещения с использованием проб пациентов и рекомендуемом Институтом клинических и лабораторных стандартов [72]. 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.).

### **Личный вклад автора**

Диссертантом лично разработан дизайн исследования, организована и спланирована научно-исследовательская работа. Автор проанализировал данные литературы о современных лабораторных возможностях методов терапевтического лекарственного мониторинга, проблемах иммуносупрессивной терапии и особенностях применения эверолимуса у реципиентов трансплантированного сердца. 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.

### **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 в т.ч. 2 в журналах, входящих в перечень, индексируемых в Scopus.

### **Внедрение результатов исследования 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 с клиникой ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

### **Объем и структура работы**

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).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

### КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СЕРДЦА

#### 1.1 Трансплантация сердца – высокотехнологичный метод лечения терминальной стадии декомпенсированной сердечной недостаточности

Заболевания сердечно-сосудистой системы выступают главной причиной летальности в мире [56, 7]. По статистическим данным, от осложнений сердечно-сосудистых заболеваний ежегодно в мире погибает около 18 миллионов человек, что составляет примерно 31% всех летальных исходов [7]. Сердечная недостаточность (СН) – синдром, который развивается в результате прогрессирующего нарушения насосной функции сердца, и проявляется комплексом симптомов (одышка, слабость, увеличение частоты сердечных сокращений, астения, отечность), вызванных неспособностью сердца обеспечить ткани и органы организма необходимым количеством крови [30]. Сердечная недостаточность, как терминальная стадия развития кардиологической патологии, является острой медико-социальной проблемой и приоритетной задачей мирового здравоохранения [42, 30, 56, 28].

Эпидемиологические исследования ЭПОХА-ХСН (8 регионов РФ, 19 500 респондентов) и ЭПОХА-О-ХСН (одномоментное госпитальное исследование в 22 регионах РФ), проведенные в Российской Федерации, показывают, 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. чел. [40]. Заболеваемость ХСН неуклонно растет, в среднем – на 1,2 человека на 1000 населения в год [55]. В Европе от хронической сердечной недостаточности страдает более 14 млн человек по данным ESC (Европейское общество кардиологов). По прогнозам эпидемиологических исследований к 2050

г. по сравнению с 2010 г. будет наблюдаться увеличение распространенности ХСН на 60% за счет старших возрастных групп [14]. Основными причинами развития ХСН выступают артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, врожденные и приобретенные пороки клапанов, сахарный диабет, менее часто – токсические миокардиты, кардиомиопатии, лучевые поражения миокарда, хроническая обструктивная болезнь легких, острое нарушение мозгового кровообращения и фибрилляция предсердий. Лечение пациентов с ХСН включает в себя немедикаментозную и медикаментозную консервативную терапию, а также хирургическую коррекцию патологии по показаниям. Медицина достигла уже значительных успехов в лечении хронической сердечной недостаточности на терминальной стадии, но для некоторых пациентов единственным вариантом медицинской помощи остается трансплантация сердца, которая выступает “золотым стандартом”, улучшающим прогноз и качество жизни больных [12]. Примерно 5% пациентов с ХСН III-IVФК нуждаются в проведении данной операции [55].

Трансплантационная кардиология начала активно развиваться в 1940–1950 гг. XX века. Первые попытки пересадки сердца были проведены на животных. Значительный вклад в развитие техники трансплантации сердца внес отечественный ученый Демихов В.П. 3 декабря 1967 г. Кристианом Барнардом была проведена первая пересадка сердца в мире, завершившаяся успехом [17, 10]. Первые попытки пересадки сердца у человека в Советском Союзе, выполненные Вишневым А. А. (1968 г.), Соловьевым Г. М. (1971 г.), Бураковским В.И. (1983 г.), завершились неудачно. Через 20 лет после первой пересадки сердца в мире Шумаков В.И. в Советском Союзе в НИИ трансплантологии и искусственных органов провёл первую успешную трансплантацию сердца [15].

Каждый год в мире проводится более 6000 пересадок сердца [12, 20]. Значительная часть трансплантаций сердца выполняется в Европе и Северной Америке. Количество производимых трансплантаций сердца ежегодно растет и в Российской Федерации. В 2015 г. в России было выполнено 179 пересадок сердца, что на 35,6% больше по сравнению с 2012 годом. В 2017 году на территории



нашей страны количество трансплантаций сердца достигло 252. В 2020 г. частота проводимых операций по пересадке сердца составила 251 операцию, 6 из которых была выполнена детям.

За последние 15 лет в Российской Федерации наблюдается увеличение числа лиц в листе ожидания трансплантации сердца почти в 2 раза. В 2020 г. лист ожидания в нашей стране включал 708 пациентов, из которых 303 были включены в лист ожидания впервые, а общее количество реципиентов сердца составило 1524 человека, по данным Федерального регистра. А по данным регистра Всемирного общества сердечно-лёгочных трансплантологов, на сегодняшний день всего в мире произведено уже более 110 тыс. пересадок сердца [51].

Трансплантация сердца - высокотехнологичный метод помощи людям с критической острой или декомпенсированной хронической сердечной недостаточностью, риск смерти которых в течение года превышает 50%, а использование других методов лечения невозможно [53]. На сегодняшний день, с учетом достижений в вопросах пересадки сердца, медиана выживаемости пациентов составляет 14 лет, что требует дальнейших научных исследований [11]. Одной из основных проблем, определяющих прогноз для пациентов после трансплантации сердца, выступает отторжения трансплантированного сердца [51, 8, 11]. По данным литературы, отторжение сердечного трансплантата является одной из лидирующих причин смерти пациентов в первые 3 года после пересадки сердца [46].

Отторжение сердечного аллотрансплантата представляет собой воспалительный процесс пересаженного сердца в результате активации системы гуморального и/или клеточного иммунитета, который приводит к нарушению функции органа [20, 21]. Именно проблема отторжения пересаженного сердца на долгие годы приостановила активное использование этого высокотехнологичного метода до единичных операций. Реакция «трансплантат против хозяина», лежащая в основе развития отторжения, обусловлена функционированием главного комплекса гистосовместимости (МНС) [54, 37]. Гены этого комплекса кодируют антигены тканевой совместимости (HLA). Донорские антигены, находящиеся на

поверхности клеток пересаженного органа, вызывают у реципиента активацию Т-лимфоцитов прямым и непрямым путём. Прямой путь основан на взаимодействии CD-3-рецептора Т-лимфоцита реципиента с антигенпрезентирующими клетками донорского сердца и лежит в основе механизма формирования острого отторжения трансплантата. Непрямой путь реализуется через взаимодействие CD-28 Т-лимфоцита с CD-80 и CD-86 антигенпрезентирующих клеток, что вызывает синтез антител и развитие хронического отторжения, лежащей в основе васкулопатии пересаженного сердца [11]. Вышеуказанные взаимодействия вызывают активацию серин-треониновой протеинкиназы (mTOR), ответственной за регуляцию клеточного цикла, вызывая быстрое увеличение количества Т-лимфоцитов [54, 23, 37].

В зависимости от патогенеза и клинической картины, выделяют сверхострое отторжение, острое клеточное и/или гуморальное отторжение и хроническое отторжение (Международное общество трансплантации сердца и лёгких).

Острое клеточное отторжение встречается у 40% пациентов, перенесших пересадку сердца и чаще всего возникает в первые 6 месяцев после трансплантации.

Выделяют 3 степени острого клеточного отторжения (Классификация острого клеточного отторжения - ISHLT-2004):

- 1) Степень 0R устанавливается, когда при проведении морфологического исследования биоптатов миокарда не обнаруживаются отрицательные гистологические и иммунопатологические признаки.
- 2) При обнаружении мононуклеарной инфильтрации миокарда и/или единичного очага повреждения кардиомиоцитов диагностируется степень 1R.
- 3) Обнаружение множественных очагов повреждения кардиомиоцитов на фоне мононуклеарной инфильтрации оценивается как степень 2R.
- 4) Мононуклеарная инфильтрация в комбинации с диффузным повреждением кардиомиоцитов и/или признаками отека, кровоизлияний или васкулита - степень 3R.

10% реципиентов сердечного трансплантата сталкиваются с развитием острого гуморального отторжения в первые несколько недель после пересадки сердца [21].

Острое гуморальное отторжение классифицируется по морфологическим признакам (ISHLT-2013), определяемым путём гистологического и иммуногистохимического исследования биоптатов миокарда, и подразделяется на:

- 1) Острое гуморальное отторжение rAMR(0) описывается при отсутствии гистологических и иммуногистохимических признаков отторжения.
- 2) Острое гуморальное отторжение rAMR(1) определяется при наличии или гистологических признаков, или иммунофлуоресцентных признаков:

2.1) Острое гуморальное отторжение rAMR1(H+) характеризуется наличием гистологических признаков, таких как активация эндотелия сосудов, периваскулярная клеточная инфильтрация, интерстициальный отек, некроз кардиомиоцитов.

2.2) Острое гуморальное отторжение rAMR1(I+) устанавливается при наличии только иммунофлуоресцентных признаков.

- 3) Острое гуморальное отторжение rAMR(2) диагностируется при наличии и гистологических, и иммунофлуоресцентных признаков.
- 4) Острому гуморальному отторжению с выраженными гистологическими признаками и распространенным свечением C4dкомпонента комплемента в стенке сосудов миокарда присваивается степень - rAMR(3).

Хроническое отторжение пересаженного сердца развивается спустя 6 мес. и позднее после пересадки. По данным 35 ISHLT (Международный регистр трансплантации сердца и лёгких) васкулопатия пересаженного сердца развивается в первый год после пересадки сердца у 8% пациентов, в первые 10 лет - у 47% больных, к 15 годам после пересадки сердца процент реципиентов с этим диагнозом достигает 56%, к 20 годам – 59%. Выявление васкулопатии сердечного аллотрансплантата у реципиентов способствует увеличению риска смерти в 2 раза [19, 47].

Классификация васкулопатии сердечного трансплантата (ISHLT-2010):

- 1) САV(0) (незначительная васкулопатия) характеризуется отсутствием изменений, выявляемых при проведении ангиографии.
- 2) САV(1) (легкая васкулопатия) устанавливается при стенозе ствола левой коронарной артерии менее 50%, основных ветвей – менее 70% без нарушения функции органа.
- 3) САV(2) (умеренная васкулопатия) диагностируется при стенозе ствола левой коронарной артерии менее 50%, основных ветвей – более 70%, или любой ветви второго порядка – более 70% без нарушения функции органа.
- 4) САV(3) (выраженная васкулопатия) определяется при: 1) стенозе ствола левой коронарной артерии менее 50%, больше двух основных ветвей – более 70%, или любой ветви второго порядка более 70% во всех основных бассейнах; 2) при САV(1), или САV(2) в сочетании с нарушением функции пересаженного сердца, сопровождаемой снижением фракции выброса левого желудочка более 45% с нарушением локальной сократимости); 3) признаках значительной рестриктивной диастолической дисфункции.

Для диагностики отторжения трансплантата с установлением формы и степени проводится иммуногистохимическое исследование биоптатов миокарда [8].

Риски развития отторжения сердечного трансплантата присутствуют на протяжении всей жизни реципиента, но самые большие наблюдаются в первые несколько месяцев после трансплантации [20]. С целью профилактики отторжения реципиентам сердца показана пожизненная иммуносупрессивная терапия [24].

## **1.2 Иммуносупрессивная терапия у реципиентов трансплантированного сердца**

Иммуносупрессивная терапия у реципиентов трансплантированного сердца выполняется в несколько этапов: 1) однократный прием иммуносупрессантов в периоперационном периоде; 2) индукция, проводимая в раннем послеоперационном периоде с целью профилактики острого отторжения трансплантата; 3) поддерживающая терапия, проводимая пожизненно.

Для проведения вторичной профилактики острого отторжения пересаженного сердца проводится индукционная иммуносупрессивная терапия, которая включает в себя введение лекарственных препаратов с мощным иммунодепрессивным действием в первые и четвёртые сутки [22, 20, 121]. Необходимость применения мощных иммуносупрессантов в этом периоде объясняется максимальными рисками острого отторжения в раннем послеоперационном периоде из-за выраженной экспрессии донорских антигенов на фоне агонального состояния и хирургической травмы [24, 76]. Индукционная иммуносупрессивная терапия проводится следующими лекарственными препаратами: антимоноцитарный иммуноглобулин (тимоглобулин, АТГ, атгам); антагонисты рецепторов ИЛ-2 (базиликсимаб, даклизумаб); анти-CD52 антитела (алемтузумаб). Тактика проведения индукционной терапии определяется индивидуально для каждого пациента исходя из рисков острого отторжения трансплантата и сопутствующих заболеваний и осложнений [20].

Для формирования схемы базовой пожизненной иммуносупрессивной терапии у реципиентов трансплантированного сердца применяют различные сочетания следующих групп лекарственных препаратов: глюкокортикоиды, ингибиторы кальциневрина (циклоспорин или такролимус), препараты микофеноловой кислоты (микофенолата мофетил или микофенолат натрия), ингибиторы пролиферативного сигнала mTOR (эверолимус или сиролимус) [23].

Глюкокортикостероиды (ГКС) показаны всем реципиентам трансплантированного сердца с постепенным снижением дозы (3-6 мес.) и последующей отменой у лиц с низким иммунологическим риском. Механизм действия глюкокортикостероидов заключается в угнетении активации Т-лимфоцитов путём подавления синтеза провоспалительных цитокинов, фактора некроза опухоли - альфа, гамма-интерферона за счет ингибирования ядерного фактора активации лимфоцитов. ГКС проявляют выраженное иммунодепрессивное действие и оказывают сильный противовоспалительный эффект. Одновременно с хорошей эффективностью, глюкокортикоиды характеризуются и выраженными неблагоприятными побочными эффектами,

среди которых артериальная гипертензия, сахарный диабет, дислипидемия, остеопороз [4, 18, 1].

Ингибиторы кальциневрина (такролимус, циклоспорин) назначаются всем реципиентам трансплантированного сердца для осуществления базовой иммуносупрессивной терапии. Внедрение именно этой группы препаратов в клиническую практику позволило достоверно увеличить годовую выживаемость лиц после пересадки сердца до 90%, и пятилетнюю - до 75% [24].

В настоящее время у пациентов после пересадки сердца активно используются два представителя этой группы: циклоспорин и такролимус. Механизм действия этих препаратов сходен и заключается в ингибировании фосфатазной активности кальциневрина, что приводит к подавлению дефосфорилирования и транслокации в ядро ядерного фактора Т-лимфоцитов. Результатом этого эффекта становится подавление транскрипции генов интерлейкина-2, интерферона- $\gamma$ , фактора-альфа некроза опухолей и нарушение дифференцировки и пролиферации Т-лимфоцитов [33]. Ряд научных исследований продемонстрировал более высокую эффективность такролимуса по отношению к острому отторжению трансплантата, и более благоприятный профиль по побочным эффектам по отношению к циклоспорину, что делает такролимус ингибитором кальциневрина первой линии при трансплантации сердца [125].

Накопленный опыт показал, что ингибиторы кальциневрина способствуют возникновению комплекса неблагоприятных эффектов, таких как артериальная гипертензия, нефротоксичность, гирсутизм, гингивит [27, 136, 69]. Особое место в структуре осложнений у пациентов, принимающих ингибиторы кальциневрина, занимает хроническая почечная недостаточность в результате нефротоксичности препаратов. Данная проблема решается двумя путями: формированием схемы иммуносупрессивной терапии с минимальными концентрациями ингибиторов кальциневрина и проведением мониторинга концентраций препаратов во время лечения [23]. Важным вопросом в терапии циклоспорином и такролимусом, является индивидуальный подбор дозы препаратов и контроль концентраций в

крови ввиду выраженной вариабельности фармакокинетики препаратов [65, 116, 78, 132].

Препараты микофеноловой кислоты (микофенолата мофетил, микофенолат натрия) являются антипролиферативными препаратами, показанными реципиентам трансплантированного сердца в составе поддерживающей иммуносупрессивной терапии в комбинации с глюкокортикостероидами и ингибиторами кальциневрина. Препараты данной группы подавляют лимфоцитарную пролиферацию за счет подавления активности фермента инозинмонофосфатдегидрогеназы. Долгое время единственным представителем данной группы препаратов оставался азатиоприн, использование которого прекратилось с появлением препаратов микофеноловой кислоты за счет большей эффективности последних [22, 76].

Ингибиторы пролиферативного сигнала (ингибиторы мишени рапамицина млекопитающих) рекомендуются к использованию у реципиентов трансплантированного сердца с почечной недостаточностью, сопутствующими онкологическими заболеваниями и развивающейся васкулопатией трансплантированного сердца, в виду его большей эффективности и положительной прогностической значимости в этих случаях. Однако высокие риски побочных эффектов ограничивают использование препаратов. Не рекомендуется использование ингибиторов пролиферативного сигнала у реципиентов сердца в раннем послеоперационном периоде после пересадки из-за высокой частоты побочных эффектов. Представителями этого класса препаратов являются сиролимус и эверолимус.

### **1.3 Эверолимус в структуре иммуносупрессивной терапии у реципиентов трансплантированного сердца**

Одним из препаратов, успешно применяемых у пациентов после трансплантации сердца в составе поддерживающей иммуносупрессивной терапии является ингибитор mTOR – эверолимус [22, 131]. Иммуносупрессант был синтезирован как аналог сиролимуса, путем замещения 2-гидроксиэтиловой цепи в 40 положении молекулы последнего. Сиролимус – ферментационный продукт

жизнедеятельности *Streptomyces hydroscopicus*, который был впервые выделен в 1965 году из проб почвы, забранной на острове Пасха, более известный как *Rapa Nui*, что дало название препарату, как рапамицин [96]. Первые исследования препарата проводились в середине 1970-х годов, продемонстрировавшие его противогрибковые свойства. А уже в 1977 году было доложено о том, что препарат обладает иммуносупрессивным эффектом, смоделированным на крысах с аллергическим энцефаломиелитом и адьювантным артритом. Спустя двенадцать лет, в экспериментальных работах была показана длительная сохранность сердечного трансплантата у крыс и почечного трансплантата у свиней и собак. Стала очевидной позиция сиролимуса, как перспективного иммуносупрессивного лекарственного препарата [96, 115, 73].

Эверолимус является препаратом, обладающим выраженным иммунодепрессивным эффектом, фармакологическое действие которого основано на ингибировании протеинкиназы (серин-треониновая киназа, 289-кДа) mTOR (мишени рапамицина млекопитающих), занимающую центральную роль в регуляции роста, пролиферации и выживаемости лимфоцитов.

Механизм действия эверолимуса заключается в том, что при попадании внутрь клетки, препарат соединяется с внутриклеточным протеином FKBP12 (семейство FK506), образуя при этом соединение, ингибирующее комплекс mTORC1, состоящий из регуляторного белка и серин-треониновой киназы mTOR. Угнетение комплекса mTORC1 приводит к нарушению сигнальной передачи, ответственной за рост и развитие клеток [85, 62, 139].

Ингибитор пролиферативного сигнала эверолимус является зарегистрированным лекарственным препаратом для профилактики отторжения сердечного трансплантата в комбинации с другими лекарственными средствами базовой иммуносупрессивной терапии (циклоспорин, глюкокортикостероиды) у взрослых пациентов [20].

Эверолимус обладает значительными благоприятными эффектами, позволяющими считать его препаратом выбора для проведения иммуносупрессии у реципиентов трансплантированного сердца. Препарат положительно влияет на



сосудистое ремоделирование, снижает выраженность гиперплазии интимы сосудов сердечного трансплантата, улучшает прогноз по манифестации цитомегаловирусной инфекции [82]. Включение эверолимуса в иммуносупрессивную схему у реципиентов сердечного трансплантата снижает частоту возникновения васкулопатии трансплантата за счет антипролиферативного и антиангиогенного действия [52, 126, 84, 68, 122].

Опыт применения иммуносупрессантов показывает, что использование иммунодепрессантов способствует усилению онкогенеза, что объясняется ослаблением противоопухолевого иммунитета [34]. Эверолимус обладает антионкогенным эффектом, что является явным положительным свойством. Противоопухолевая активность эверолимуса реализуется за счет угнетения сигнального пути, который регулирует деление и рост клеток, образование факторов роста [84]. Результаты доклинических и клинических исследований убедительно продемонстрировали противоопухолевые качества эверолимуса. Одними из показаний для назначения эверолимуса являются злокачественные опухоли, т. к. распространенный почечно-клеточный рак [79], рак молочной железы, нейроэндокринные гастроэнтеропанкреатические опухоли [101] и др. Хорошие результаты эверолимус продемонстрировал и в лечении рецидивирующей множественной миеломы и рака желчных путей [99, 70].

Одной из главных возможностей, появившихся с внедрением эверолимуса в схему иммуносупрессивной терапии у реципиентов трансплантированного сердца, является снижение дозы ингибиторов кальциневрина, которые обладают выраженной нефротоксичностью, уменьшая тем самым риски развития почечной недостаточности [22, 8, 92].

Важнейшим условием эффективной иммуносупрессивной терапии эверолимусом, обеспечивающей сохранность трансплантата и безопасность в отношении передозировки, является поддержание концентрации препарата в пределах терапевтического коридора [32, 118]. Эверолимус характеризуется узким терапевтическим индексом, что позволяет отнести его к «препаратам критической дозы». Малые сдвиги концентрации эверолимуса в крови могут привести к

существенному снижению положительного фармакологического эффекта с повышением рисков развития отторжения трансплантата, или же клиническому проявлению токсичности [128].

#### **1.4 Химическая характеристика и фармакокинетика эверолимуса**

Эверолимус – макролидный иммуносупрессант с молекулярной массой 957,6 Да ( $C_{53}H_{83}NO_{14}$ ).

Вещество растворимо в спирте и органических растворителях, практически нерастворимо в воде. Триеновая группа эверолимуса обуславливает максимальное поглощение ультрафиолета при 276 нм. Препарат чувствителен к свету. Стоковый раствор эверолимуса стабилен 6 мес. при температуре  $-80^{\circ}C$ . В холодильнике ( $+4^{\circ}C$ ) стоковые растворы эверолимуса теряют около 14% своей концентрации в течение 14 дней. В образцах цельной крови эверолимус выдерживает 3 цикла замораживание / размораживание. Образцы крови с препаратом при температуре ( $-80^{\circ}C$ ) стабильны до 8 мес. [96].

Пероральная биодоступность эверолимуса низкая (16%). Препарат характеризуется быстрой всасываемостью (через 30 мин. после приема). Максимальная концентрация эверолимуса после приема 4 мг составляет  $44,2 \pm 13,3$  мкг/л. через 30 мин. (0,5-2,5 ч.) [96], 2,5 мг –  $45 \pm 21$  мкг/л., 1 мг -  $13,8 \pm 3,1$  мкг/л. Площадь под кривой «концентрация/время» пропорциональна дозе [96, 115]. Важно отметить, что сильное влияние на абсорбцию эверолимуса оказывает одновременный прием жирной пищи. В исследованиях у здоровых добровольцев пища с высоким содержанием жиров задерживала  $t_{max}$  эверолимуса в среднем на 1,25 часа, приводила к снижению максимальной концентрации на 60% и площади под фармакокинетической кривой на 16% [97, 118].

В терапевтических концентрациях более 75% препарата содержится в эритроцитах, и приблизительно 75% фракции плазмы связаны с белками [97, 96].

Эверолимус метаболизируется при помощи P450(CYP)3A4, P450(CYP)3A5 и P450(CYP)2C8 в печени и P-гликопротеина в тонком кишечнике, соответственно. CYP3A4 – наиболее важный фермент в метаболизме эверолимуса. Большинство широко известных метаболитов эверолимуса являются продуктами

представленной ферментной системы. Метаболиты образуются в результате гидроксилирования или деметилирования эверолимуса [96, 73, 106]. 4 основных метаболита эверолимуса, образуемых под действием P450(CYP)3A4: гидрокси-эверолимус, дигидрокси-эверолимус, деметил-эверолимус и форма эверолимуса с разомкнутым макролидным кольцом [96]. Полный метаболический профиль эверолимуса, описанный в литературе, включает в себя 11 метаболитов [118]. Генетические полиморфизмы этой системы могут влиять на метаболизм препарата. Все метаболиты в крови регистрировались через 1,2–2,0 ч. после введения эверолимуса и не имеют существенной иммуносупрессивной активности [115]. Средний период полураспада эверолимуса – 18–35 часов. Коррекция дозы эверолимуса должна основываться на концентрациях, полученных через 4–7 дней после предыдущего изменения дозы.

Лекарственное взаимодействие может проявляться повышением концентрации эверолимуса при одновременном приеме с умеренными ингибиторами CYP3A4 и P-гликопротеина [118, 131, 74].

98% всей фракции эверолимуса экскретируется с желчью в форме метаболитов и только 2% - с мочой. Печеночная недостаточность оказывает существенное влияние на фармакокинетику эверолимуса [118]. Соответственно, эверолимус, как правило не удаляется при помощи диализа [115].

Экспериментальные исследования на обезьянах продемонстрировали содержание наибольших концентраций эверолимуса в желчном пузыре, поджелудочной железе, мозжечке, лёгких, почках и селезенке [96].

### **1.5 Побочные эффекты эверолимуса**

По данным систематического обзора, проведенного в 2020 г. при проведении терапии эверолимусом, исследователи описывают ряд побочных эффектов, представленных в таблице 1.

**Таблица 1. Побочные эффекты эверолимуса**

Побочный эффект	Кол-во случаев (%)
Анемия	2 534 / 10 386 (24,4)

Продолжение таблицы 1	
Анорексия	534 / 2 120 <b>(25,2)</b>
Астения	1 415 / 6 847 <b>(20,6)</b>
Диарея	2 330 / 10 436 <b>(22,3)</b>
Усталость	2 780 / 11 436 <b>(23,7)</b>
Гиперхолестеринемия	1 078 / 5 346 <b>(20,2)</b>
Гипергликемия	1 853 / 10 878 <b>(16,9)</b>
Лейкопения	495 / 1 672 <b>(29,6)</b>
Пневмонит	628 / 6 201 <b>(10,1)</b>
Зуд	386 / 3 187 <b>(12,1)</b>
Гипертермия	1 069 / 6 961 <b>(15,4)</b>
Сыпь	2 302 / 10 114 <b>(22,7)</b>
Стоматит	3 568 / 8 259 <b>(43,2)</b>
Тромбоцитопения	1 195 / 5 533 <b>(21,8)</b>
Рвота	883 / 5 913 <b>(15)</b>

Злокачественные новообразования остаются одной из главных причин смертности у пациентов, перенесших трансплантацию органов, в том числе и сердца [84, 137, 124]. В структуре летальности пациентов после пересадки солидных органов на злокачественные новообразования приходится от 10 до 27% [5]. Результаты проведенного метаанализа, посвященного оценке рисков развития онкологических заболеваний у людей после трансплантации органов, проведенного Z. Нюо et al. и включающего в себя 2 105 122 пациента, показал: общий риск развития онкологического заболевания в исследуемой группе по сравнению с общей популяцией выше в 2,68 раза, а у реципиентов сердца – в 3,72 [86]. Факторы, обуславливающие большую заболеваемость онкологической патологией у пациентов после трансплантации органов, включают в себя отягощенный онкологический анамнез донора и реципиента, и непосредственно пожизненную терапию иммунодепрессантами, которая способствует снижению противоопухолевого иммунитета, повышая риски развития раковых клеток и репликацию онкогенных вирусов [23]. Ведущие позиции в структуре

онкологической заболеваемости занимают в первую очередь опухоли, вызванные вирусными инфекциями: рак шейки матки и рак анального канала (HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 50), неходжкинская лимфома и лимфома Ходжкина (вирус Эпштейна-Барр), саркома Капоши (HHV8), рак печени (вирус гепатита С и вирус гепатита В) [5]. Важно отметить, что все основные группы иммуносупрессивных препаратов, назначаемых пациентам после пересадки сердца, кроме ингибиторов пролиферативного сигнала mTOR, обладают прямым про-онкогенным эффектом, реализуемым различными механизмами [23].

Ингибиторы mTOR по сравнению с другими иммуносупрессивными препаратами, характеризуются различными антионкогенными эффектами, а эверолимус рекомендован для лечения некоторых видов рака. Ряд исследований, проведенных в группе пациентов после трансплантации почки, продемонстрировали более низкую частоту возникновения злокачественных новообразований, чем в группах с другими протоколами иммуносупрессивной терапии. Этот факт делает ингибиторы пролиферативного сигнала – препаратами выбора у пациентов после пересадки сердца с высокими рисками возникновения злокачественных новообразований.

Инфекционные осложнения являются одним из наиболее важных дозозависимых побочных эффектов (риск развития инфекционных заболеваний растет с повышением дозы), и проявляются при превышении концентрации препарата в крови целевых значений (3–8 нг/мл), что объясняется выраженностью подавления иммунного ответа [110, 119].

Распространенным побочным эффектом эверолимуса является метаболическая токсичность [98, 109, 120]. Одним из метаболических нарушений выступает гиперлипидемия, частота которой среди пациентов, по данным некоторых авторов, достигает 75% [93]. Обзор неблагоприятных эффектов эверолимуса, связанных с липидным обменом, продемонстрировал гипертриглицеридемию у 4% пациентов, принимавших эверолимус и гиперхолестеринемию у 16%. В метаанализе пациентов с распространенными злокачественными новообразованиями, получавших ингибиторы mTOR, частота гипертриглицеридемии составила 35%, а

частота гиперхолестеринемии - 32% [120]. Таким образом, исследования продемонстрировали достоверно более высокий уровень гиперлипидемии у пациентов, принимающих эверолимус по сравнению с контрольной группой [107]. Важно отметить, что эверолимус обладает дозозависимым липидоповышающим действием [109]. Описаны несколько механизмов, способствующих нарушению липидного профиля у пациентов, принимающих эверолимус: активация гена СПП А, который является ингибитором липопротеидлипазы, повышение экспрессии белка, связывающего жирные кислоты адипоцитов, и снижение катаболизма липопротеинов, содержащих апо В 100 [109]. Дислипидемия является известным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Более агрессивное течение атеросклероза у пациентов после пересадки сердца повышает риски развития васкулопатии сердечного аллотрансплантата (болезнь коронарных артерий трансплантата), оказывающего серьезное влияние на прогноз и качество. Профилактика данного состояния является крайне актуальной и заключается, основываясь на дозозависимости данного проявления, в поддержании концентрации эверолимуса в процессе терапии в рамках терапевтического диапазона [87].

Гипергликемия – один из основных побочных эффектов, частота которого достигает от 12 до 50% [123]. Механизм гипергликемии, индуцированной эверолимусом, еще предстоит выяснить. На сегодняшний день результаты исследований позволяют предположить, что эверолимус нарушает секрецию инсулина за счет угнетения пути сигнальной передачи mTOR в бета-клетках поджелудочной железы [123]. Данное свойство эверолимуса увеличивает риски возникновения сахарного диабета 2 типа у пациентов, принимающих препарат [63; 133].

В рандомизированных контролируемых исследованиях была показана гематологическая токсичность эверолимуса [110, 104, 129]. Частота гематологической токсичности, связанной с эверолимусом, составляет: анемия – 38,8%; лейкопения – 19,6%, нейтропения – 14,9%; тромбоцитопения - 36,0%; [104]. Также было изучено влияние ингибиторов mTOR на показатели красной

крови, которые продемонстрировали, что препараты данной группы вызывают микроцитоз эритроцитов *in vivo* и *in vitro* [89]. Важно отметить, что гематологическая токсичность также, как и все остальные представленные побочные эффекты, является дозозависимым [113, 129].

В научных работах отмечается увеличение случаев протеинурии у пациентов, принимающих эверолимус впервые, что объясняется повреждением подоцитов эверолимусом [131, 124]. В исследованиях В2309 через год после начала применения эверолимуса в дозе 1,5 мг/сут. частота протеинурии составила 9,1%, а при увеличении дозировки до 3 мг/сут. - 12,9%. Результаты этих исследований демонстрируют связь между приемом эверолимуса и возникновением протеинурии, а также указывают на дозозависимость этого побочного эффекта. Данные указывают не только на связь эверолимуса и протеинурии, но и на дозозависимость последней [95].

Стоматит представляет собой один из наиболее часто встречающихся побочных эффектов эверолимуса, значительно ухудшающих качество жизни пациентов [61, 124]. Анализ литературы показал, что общая частота возникновения стоматита после лечения эверолимусом составляет 42,6% [61].

В результатах различных научных исследований также описаны такие побочные эффекты как: осложнения заживления ран, периферические отеки, ангионевротический отек, увеличение АЛТ и АСТ [77, 60, 124].

## **1.6 Лабораторные методы терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса**

Терапевтический лекарственный мониторинг является одним из направлений в лабораторной и клинической практике, целью которого является определение концентрации лекарственного препарата в какой-либо биологической жидкости для подбора оптимального режима дозирования, достижения должной эффективности лекарственной терапии и снижения риска токсических проявлений [44, 43, 71, 66, 138]. Терапевтический лекарственный мониторинг выступает инструментом в персонализации фармакотерапии, позволяя проводить индивидуальный подбор дозы препарата, что поддерживает основную

современную концепцию медицины [108, 138, 90, 102]. Именно терапевтический лекарственный мониторинг являлся одним из первых внедренных возможностей современной практики персонализированной медицины.

Основополагающей концепцией терапевтического лекарственного мониторинга является то, что эффективность и безопасность лекарственной терапии больше зависит от концентрации лекарственного средства в крови, чем от дозы. Следовательно, для того, чтобы развился достаточный желаемый фармакодинамический эффект без развития передозировки, концентрация лекарственного препарата в крови должна быть в пределах «терапевтического окна» [31, 138].

Проведение фармакокинетических исследований осуществляется только для определенного перечня лекарственных препаратов и только у определенных групп больных, относящихся к группам высокого риска по развитию побочных эффектов фармакотерапии. Проведение терапевтического лекарственного мониторинга имеет смысл в следующих ситуациях: если наблюдается значительная межиндивидуальная вариация фармакокинетических показателей, отсутствует прямая зависимость между дозой препарата и концентрацией в крови, если вещество обладает узким терапевтическим диапазоном, если проявления токсичности препарата схожи с симптомами основного заболевания [50, 111, 114; 88]. Препараты, демонстрирующие данные свойства, включаются в перечень лекарств, подлежащих обязательному терапевтическому лекарственному мониторингу у всех пациентов, получающих данные препараты. Перечень лекарственных препаратов, подлежащих обязательному мониторингу в Российской Федерации, регламентируется приказом министерства здравоохранения РФ №64 от 21.02.2000 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований».

Кроме того, возможно изменение фармакокинетики препаратов в результате особенностей метаболизма у пациентов с почечной недостаточностью, различной патологией печени, заболеваниями желудочно-кишечного тракта, беременных женщин, больных пожилого и детского возраста [25, 26, 38, 59, 91]. Особого



внимания заслуживают больные, вынужденные принимать одновременно несколько групп препаратов с потенциальной возможностью межлекарственных взаимодействий [48].

Терапевтический лекарственный мониторинг представляет собой процесс, состоящий из пяти этапов: запрос клинициста на определение концентрации лекарственного средства, забор биологического материала, количественный анализ концентрации лекарственного средства в лаборатории, интерпретация полученных результатов, оптимизация лечения на основе информации о текущем состоянии пациента и полученных лабораторных результатах [66]. Терапевтический лекарственный мониторинг является междисциплинарной медицинской отраслью, которая подразумевает участие специалистов лечебных направлений, фармакологов, токсикологов, врачей клинической лабораторной диагностики [111]. Наиболее важным является аналитический этап, на котором происходит количественное определение препаратов в биологических жидкостях. Литературные данные демонстрируют, что 12% от всех ошибок лабораторных исследований приходится именно на аналитический этап [6].

Лабораторный метод, предназначенный для проведения терапевтического лекарственного мониторинга, должен удовлетворять ряду требований, среди которых высокая чувствительность, специфичность, воспроизводимость, простота использования, невысокая стоимость исследования, возможность автоматизации, универсальность. Критическими параметрами метода являются чувствительность, скорость, точность, возможность работы с малым объемом биоматериала [114].

Существует большое число методов количественного определения лекарственных средств в биологическом материале: хроматографические, микробиологические, спектрофотометрические, полярографические, иммунологические, радиоизотопные и др. [114]. В современных лабораториях наиболее широко используются два лабораторных метода: иммунохимический анализ и жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) [64].

### 1.6.1 Иммунохимический метод

Иммунодиагностические методики многочисленны и широко используются в лабораторной и клинической практике для определения токсинов, гормонов, наркотиков и лекарственных препаратов в том числе [2, 9, 49, 3, 117]. Принцип иммунологических методов исследования заключается во взаимодействии иммунных агентов – антител и антигенов [41, 29, 13]. Антитела, связанные с определенной меткой, взаимодействуют с анализируемым веществом, выступающим в роли антигена. Далее происходит регистрация меченых комплексов разными способами. Для индикации образующего комплекса «антиген-антитело» используются изотопные, ферментные, флюоресцентные и парамагнитные метки. Чем больше концентрация аналита в образце, тем больше образуется комплексов [41, 29].

Антитела – специфические иммуноглобулины, синтезируемые целенаправленно для конкретного аналита, являются центральным компонентом в любой модификации иммунохимического анализа. Производство антител, используемых для иммунохимического анализа, не требует больших временных, финансовых и трудовых ресурсов, что делает их доступными для лабораторных работ. К тому же, для выполнения иммунохимического анализа необходимо небольшое количество антител. Например, количество иммунной сыворотки, полученной от одного кролика, будет достаточно для проведения иммунохимического анализа более чем в 5 млн образцов. Это делает метод доступным по цене.

Говоря о стоимости, нужно отметить, что иммунохимический метод не требует больших первоначальных капиталовложений на приобретение относительно недорогого оборудования. Для анализа обычно достаточно 0,05–0,2 мл сыворотки.

Важным достоинством иммунохимического метода терапевтического лекарственного мониторинга является простота использования автоматических и полуавтоматических иммунохимических анализаторов. Иммуноферментный метод может использоваться в любой лаборатории. Для выполнения исследований

достаточно иметь в штате лаборатории врача клинической лабораторной диагностики, задачами которого является калибровка оборудования, проведение контроля качества, контроль работы среднего медицинского персонала, а также интерпретация полученных результатов и фельдшера-лаборанта, осуществляющего непосредственно измерение концентрации аналита на оборудовании и регистрацию результата. Иммуноанализ требует в целом меньше специальных знаний, чем ниже представленный хроматографический метод, и может быть проведен на универсальных иммунохимических анализаторах, которые, как правило, входят в состав лабораторного парка любой клинико-диагностической лаборатории.

Существует чрезвычайно важный недостаток иммунохимического метода, заключающийся в том, что антитела будут связывать многие вещества, находящиеся в анализируемой пробе, сходные по структуре с аналитом. Данный феномен называется в аналитической химии – «перекрестная реактивность» или «кросс-реактивность». Это явление приводит к определенному завышению результата, которое в одних случаях не будет иметь клинически значимого влияния, а в других, как например, в приложении к терапевтическому лекарственному мониторингу препаратов «критической дозы» может оказать существенное значение на принимаемое решение [135, 134].

К недостаткам иммунохимического метода также можно отнести тот факт, что панель тест-систем для иммуноанализа очень ограничена. Тест-системы разработаны для наиболее актуальных групп лекарственных средств, хотя терапевтический лекарственный мониторинг требуется для значительно более широкого ряда лекарств.

Кроме того, тест-системы, используемые для иммунохимического исследования, стоят достаточно дорого. Таким образом, низкие точность, надежность, ограниченность в выборе тестов, а также высокая стоимость единичного определения делает иммунологические методы гораздо менее перспективными, чем кажется на первый взгляд.

### **1.6.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием**

Второй группой методов, активно используемых в лабораторной практике лекарственного мониторинга, является жидкостная хроматография в модификации с различными детекторами [64]. Данный перспективный метод вошел в практику как мощный аналитический инструмент, используемый в химических, медицинских, экологических, судебно-медицинских и других видах исследований [67]. Заслуга в открытии метода принадлежит Михаилу Семеновичу Цвету, который заявил о своем открытии в 1903 году на биологической секции Варшавского сообщества естественных наук [45, 57]. А уже в 1906 году первый отечественный хроматографист продемонстрировал первые научные результаты по изучению компонентов хлорофилла, используя новый метод. М.С. Цвет дал название этому методу «хроматография», который дословно переводится как «запись цвета», что обусловлено получением отдельных компонентов хлорофилла разного цвета. Далее в развитии хроматографии был провал длиной в двадцать лет, который затем сменился лавинообразным внедрением метода в научные исследования [45, 57].

Хроматография – метод аналитической химии, принцип которого заключается в разделении смеси на основании различий в скорости перемещения компонентов в системе несмешивающихся и передвигающихся по отношению друг друга фаз [39, 103]. Существует различное множество подвидов жидкостной хроматографии. Для проведения лекарственного мониторинга используется жидкость-адсорбционная хроматография, в которой подвижная фаза представлена жидкостью, а твердый адсорбент выступает в роли неподвижной фазы [94, 112, 127]. Компоненты биологической смеси разделяются между подвижной и неподвижной фазами, посредством процессов сорбции и десорбции, а разъединение веществ происходит за счет избирательной абсорбции компонентов на том или ином сорбенте. Компоненты смеси после распределения в колонке поэтапно поступают на детектор, который может быть представлен УФ –

детектором с фиксированной длиной волны, многоволновым УФ-детектором, диодной матрицей или масс-анализатором [35].

Результат хроматографического разделения смеси детектируется в виде графика зависимости концентрации искомого вещества от времени анализа (хроматограммы). Выход вещества из колонки и попадание на детектор регистрируется на хроматограмме в виде хроматографического пика. Иными словами, хроматографический пик - линия, отображающая зависимость интенсивности сигнала детектора от концентрации аналита. Принципиально важным в хроматографии является время выхода вещества из колонки, которое именуется как время удерживания вещества [35, 39].

Хроматография по своим аналитическим характеристикам превосходит иммунохимический метод, что связано с исключением перекрестной реактивности метаболитов за счет принципа метода [83, 135]. Этот факт повышает достоверность полученных результатов, что чрезвычайно важно при проведении терапевтического лекарственного мониторинга лекарственных препаратов с узким терапевтическим индексом. Более того, с позиции фармакокинетических исследований, интересным является возможность исследования с помощью хроматографии метаболитов лекарственного препарата. Хроматографический метод отличается своей универсальностью [58]. Аналитические характеристики метода позволяют разработать методики количественного определения для 95% существующих лекарственных средств, а также позволяет проводить исследование одновременно нескольких лекарственных препаратов в одной пробе, что экономически более выгодно.

Однако, такие недостатки, как большие материальные вложения в дорогостоящее оборудование, необходимость работы целой команды специалистов (врач клинической лабораторной диагностики, химик, инженер, научный сотрудник), необходимость регулярного повышения уровня знаний персонала, техническая сложность эксплуатации высокотехнологичного оборудования, заставляют потребителей делать выбор в пользу иммунохимии [36, 75].

Результат хроматографического разделения может детектироваться, как уже было сказано, целым рядом детекторов. Особого внимания заслуживает масс-спектрометр.

Масс-спектрометр – аналитическое оборудование высокого класса, принцип работы которого основан на переводе нейтральных молекул в положительно или отрицательно заряженные ионы с последующим измерением показателя  $m/z$  [16]. Использование масс-спектрометрии позволяет изучать состав сложных биологических смесей, с наивысшей точностью определить искомый аналит. Данный метод на сегодняшний день демонстрирует самые высокие показатели чувствительности и специфичности среди другого аналитического оборудования [100]. Представленный метод по праву завоевал свое место в судебной и клинической химии, фармакологии, токсикологии, биохимии и других областях науки [81, 105].

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией выступает золотым стандартом лабораторного контроля концентрации эверолимуса во всем мире. Это обусловлено в первую очередь высокой специфичностью, которая достигается исключением кросс-реактивности метаболитов препарата. Данный метод характеризуется самой высокой точностью результатов и воспроизводимостью, а также самыми низкими пределами количественного обнаружения.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

КЛД обеспечивает технологические возможности для решения задачи трансплантологии по поддержанию выживания трансплантата с одной стороны, с другой стороны по предупреждению различного рода осложнений, зависящих от качества использования иммуносупрессивных препаратов. Эту задачу выполняет ТЛМ, использующий разные лабораторные методы, которые могут конкурировать друг с другом или быть несопоставимыми, поэтому для каждой группы пациентов и конкретных клинических ситуаций обоснование выбора того или иного метода по его предпочтительным аналитическим характеристикам и отдаленным клиническим результатам является актуальной задачей.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Дизайн 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, указанные в таблице 2.

**Таблица 2. Методы выявления осложнений.**

Осложнение	Диагностическое исследование	Частота выполнения
Острое клеточное и антитело-опосредованное отторжение трансплантата	Эндомиокардиальная биопсия	1 раз в год / по показаниям
Болезнь коронарных артерий пересаженного сердца	Коронарография	1 раз в год / по показаниям
Анемия	Клинический анализ крови	1 раз в мес.

Продолжение таблицы 2		
Лейкопения	Клинический анализ крови	1 раз в мес.
Тромбоцитопения	Клинический анализ крови	1 раз в мес.
Дислипидемия	Общий холестерин	1 раз в мес.
	Триглицериды	1 раз в мес.
	ЛПНП	1 раз в мес.
	ЛПВП	1 раз в мес.
	Коэффициент атерогенности	1 раз в мес.
Инфекционные заболевания	Осмотр лечащего врача (заключение)	1 раз в мес. и при возникновении жалоб
Другие выявленные осложнения при осмотре (астения, стоматит, нарушение заживления ран, кожные проявления и др.)	Анализ амбулаторных карт	1 раз в мес.

С целью оценки клинической информативности иммунохимического метода ретроспективно был проведен анализ клинических материалов и лабораторных результатов пациентов после трансплантации сердца, принимающих эверолимус в составе двухкомпонентной поддерживающей иммуносупрессивной терапии.

С целью оценки клинической информативности ВЭЖХ-МС/МС проводилось проспективное когортное исследование, заключающееся в проведении измерения уровня концентрации эверолимуса в пробах цельной крови у исследуемой группы с оценкой клинического состояния и результатов лабораторных исследований, выполняемых при амбулаторном наблюдении, в режиме реального времени.

Период наблюдения для каждого метода составил 24 месяца.

## 2.2 Общая характеристика реципиентов

Диссертационная работа выполнена на исследовании клинических и лабораторных данных 15 пациентов, из которых 9 - мужчин, 6 - женщин, перенесшие в период с 2011 по 2015 год по жизненным показаниям ортотопическую трансплантацию сердца (рисунок 1).





*Рисунок 1. Распределение пациентов, включенных в исследование, в зависимости от гендерной принадлежности.*

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 определений уровня концентрации эверолимуса в пробах цельной крови иммунохимическим методом, и 500 – методом ВЭЖХ-МС/МС.

Структуру сопутствующей патологии системы кровообращения исследуемой группы составили: гипертоническая болезнь у 5 человек (33,3%), генерализованный атеросклероз у 5 человек (33,3%), атеросклероз брахиоцефальных артерий у 11 чел. (73,3%), облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей у 5 чел. (33,3%), флеботромбоз поверхностных вен у 3 чел. (20%), ТЭЛА у 2 чел. (13,3%), варикозная болезнь вен нижних конечностей у 5 чел. (33,3%).

Структура сопутствующей патологии желудочно-кишечного тракта включила эрозивный гастрит у 13 чел. (86,6%), хронический дуоденит у 6 чел. (40%), язвенную болезнь у 4 чел. (26,6%), ГЭРБ у 2 чел. (13,3%), хронический панкреатит у 1 чел. (6,6%), СИБР у 1 чел. (6,6%).

Остаточные явления ОНМК по ишемическому типу имели место у 3 пациентов (20%).

Структура заболеваний печени и желчевыводящих путей в исследуемой группе представлена следующими нозологиями: желчнокаменная болезнь у 5 чел. (33,3%), жировой гепатоз у 2 чел. (13,3%), вирусный гепатит С – у 1 чел. (6,6%), хронический холецистит у 6 чел. (40%).

Дислипидемия зафиксирована у 9 чел. (60%). Ожирение имело место у 6 чел. (40%).

Структура болезней органов дыхательной системы включила в себя эмфизему лёгких у 1 пациента (6,6%), у 6 пациентов (40%) – хроническую обструктивную болезнь лёгких, у 4 пациентов (26,6%) – хронический бронхит, у 1 (6,6%) пациента – бронхиальную астму.

Болезни опорно-двигательного аппарата в исследуемой группе представлены остеоартрозом крупных суставов (5 чел. – 33,3%), остеопорозом (2 чел. – 13,3%) и дегенеративно-дистрофическими заболеваниями позвоночника (7 чел. – 46,6%).

У 3 пациентов (20%) в структуру сопутствующей патологии вошла катаракта, у 1 (6,6%) – миопия.

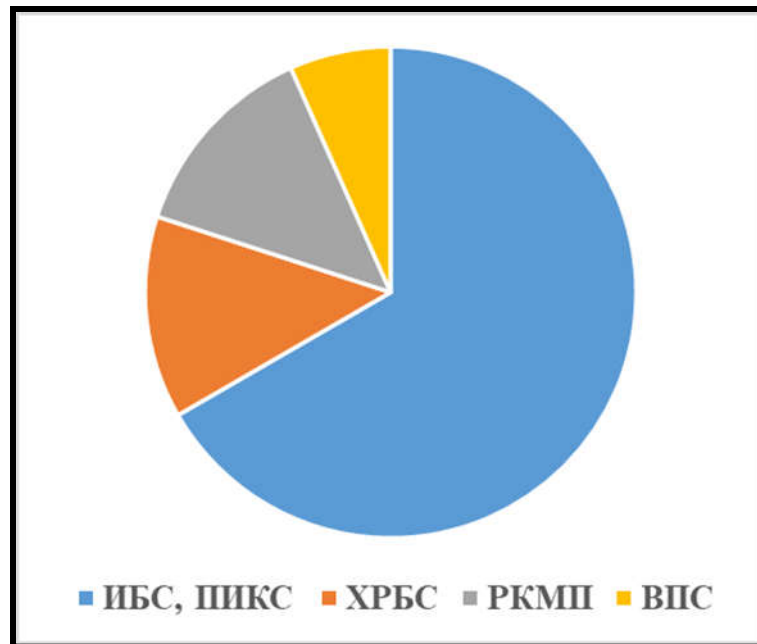
Эндокринная патология у исследуемых больных представлена аутоиммунным тиреоидитом у 2 чел. (13,3%), сахарным диабетом 2 типа у 1 чел. (6,6%) и стероидным сахарным диабетом у 2 чел. (13,3%).

Патология мочеполовой системы: хронический пиелонефрит (1 чел. – 6,6%), хроническая болезнь почек (1 чел. – 6,6%), хронический простатит (3 муж. – 33%), доброкачественная гиперплазия предстательной железы (55,5%), миома матки (3 жен. – 50%).

Также у пациентов зарегистрирована железодефицитная анемия (2 чел. – 13,3%), анемия хронических заболеваний (1 чел. – 6,6%), наследственная тромбофилия (2 чел. – 13,3%), алопеция (1 чел. – 6,6%).

Хроническая сердечная недостаточность тяжелой степени, послужившая причиной для проведения пересадки сердца, была результатом следующих нозологий: у 10 (66,6%) пациентов – ишемическая болезнь сердца, постинфарктный кардиосклероз с исходом в дилатацию камер сердца, у 2 (13,3%) – хроническая ревматическая болезнь сердца, у 2 (13,3%) – рестриктивная

кардиомиопатия, дилатационная кардиомиопатия в результате врожденных пороков сердца у 1 (6,66%) пациента (рис. 2).



**Рисунок 2. Распределение пациентов по причине развития терминальной ХСН. ИБС, ПИКС – ишемическая болезнь сердца, постинфарктный кардиосклероз с исходом в дилатацию камер сердца, ХРБС – хроническая ревматическая болезнь сердца, РКМП – рестриктивная кардиомиопатия, ВПС – врожденные пороки сердца с исходом в дилатационную кардиомиопатию.**

У всех реципиентов, включенных в диссертационное исследование, была установлена сердечная недостаточность III или IV функционального класса (классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов) (Таблица 3).

**Таблица 3. Функциональный класс сердечной недостаточности по классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA)**

Функциональный класс по NYHA	Степень ограничения физической активности и возможные клинические проявления
I ФК	Физическая активность не ограничена. Обычная физическая нагрузка не сопровождается одышкой, сердцебиением, утомляемостью, слабостью.
II ФК	Наблюдается умеренное ограничение физической активности. В покое патологические симптомы отсутствуют, а бытовая физическая нагрузка вызывает одышку, сердцебиение,

Продолжение таблицы 3	
	утомляемость, слабость и др. симптомы.
III ФК	Имеет место выраженное ограничение физической активности. Пациент чувствует себя комфортно только в состоянии покоя. Малейшие физические нагрузки вызывают появление патологических симптомов.
IV ФК	Патологические симптомы наблюдаются в покое и усиливаются при любой физической нагрузке.

Пациенты, включенные в исследование, получали индукционную терапию тимоглобулином (1 чел. – 6,6%) или базиликсимабом (14 чел. – 93,3%).

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 был выполнен перевод на эверолимус. У 6 пациентов перевод на эверолимус был выполнен по причине почечной дисфункции с целью уменьшения суточных дозировок ингибиторов кальциневрина, у 1 пациента конверсия на эверолимус была обусловлена развитием лейкопении в результате приёма микофенолата мофетила в минимальной суточной дозе, у 1 реципиента по причине развития болезни коронарных артерий сердечного трансплантата и у 7 поддерживающая иммуносупрессивная терапия была изменена на основании полученного благоприятного опыта использования эверолимуса у реципиентов сердца.

### 2.3 Методы обследования пациентов

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. Перечень, учитываемых осложнений, объем и частота исследований представлены в таблице 2.

### **2.3.1 Эндомиокардиальная биопсия**

Эндомиокардиальная биопсия выполнялась в плановом порядке 1 раз в год, либо при возникновении показаний. Исследование проводили в условиях рентген-операционной ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России. Полученные биоптаты в количестве нескольких образцов направлялись в патологоанатомическое отделение для проведения исследования с целью выявления острого отторжения трансплантата.

Методика выполнения исследования включала в себя следующие этапы: фиксация материала в 10% забуференном формалине (24 ч.), промывка, обезвоживание образцов с использованием изопропилового спирта и гистопроцессора Leica TP1020 при +60°C, заливка материала парафином и приготовление срезов (2–3 микрона), которые в дальнейшем подвергались высушиванию и депарафинизировались. Последовательным погружением в ксилол, этанол и дистиллированную воду выполнялась регидратация срезов. Окраска срезов была выполнена пикрофуксином по методу Ван Гизона.

Степень клеточного отторжения оценивалась по классификации острого клеточного отторжения (ISHLT-2004). Выявление антителоопосредованного отторжения проводилось с помощью иммуногистохимических исследований биоптатов трансплантата. Оценка степени антителоопосредованного отторжения проводилась по классификации острого гуморального отторжения (ISHLT-2013). Исследования эндомиокардиальных биоптатов проводилось в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

### 2.3.2 Коронарографическое исследование

Всем пациентам исследуемой группы в плановом порядке выполнялось коронарографическое исследование с регулярностью 1 раз в год, или внепланово по показаниям с целью выявления поражений коронарных артерий и диагностики. Коронарография проводилась в условиях рентген-операционной отделения рентгенохирургических методов диагностики и лечения ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России. Тяжесть поражения коронарного русла оценивалась по наличию стенотических поражений, их степени выраженности и расположению, степень тяжести определялась на основании рекомендаций Международного общества по трансплантации сердца и легких (Таблица 4).

**Таблица 4. Классификация тяжести поражения коронарного русла при болезни коронарных артерий пересаженного сердца.**

Классификация	Тяжесть поражения	Результат ангиографии
CAV0	Незначимо	Не выявлено нарушений
CAV1	Лёгкая	Стеноз левой коронарной артерии менее 50%, или нарушения в основном сосуде более 70%, или стеноз ветвей более 70%
CAV2	Умеренная	Стеноз левой коронарной артерии менее 50%, единичный основной сосуд более 70%, или изолированный стеноз ветвей в 2 системах более 70%
CAV3	Тяжёлая	Стеноз левой коронарной артерии более 50%, или 2 (и более) основных сосудов более 70%, или изолированный стеноз ветвей во всех 3 системах более 70%, или CAV1/CAV2 с дисфункцией трансплантата.

### 2.3.3 Лабораторные 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.

#### **2.4 Лабораторные методы измерения концентрации эверолимуса в пробах цельной крови пациентов исследуемой группы**

Для внедрения биоаналитической методики определения концентрации эверолимуса в образцах цельной крови человека хроматографическим методом в сочетании с тандемной масс-спектрометрией использовали лабораторно-инструментальный комплекс (рис. 3), состоящий из высокоэффективного жидкостного хроматографа «LC 1260 Infinity» (Agilent, США) и трехквадрупольного масс-спектрометра «TripleQuard 6460» с системой ионизации «Agilent Jet Stream-электроспрей» (AJS ESI) (Agilent, США).



***Рисунок 3. Высокоэффективный жидкостный хроматограф «LC 1260 Infinity» (Agilent, США) с масс-спектрометрическим детектором «TripleQuard 6460» с системой ионизации «Agilent Jet Stream-электроспрей» (AJS ESI) (Agilent, США).***

В качестве аналога при подборе условий определения концентрации эверолимуса в образцах цельной крови была взята методика ФГБУ «ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова» МЧС России, созданная согласно техническому заданию, составленному совместно с ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России для лабораторного блока, состоящего из высокоэффективного жидкостного хроматографа «LC 1200 Infinity» (Agilent, США) и масс-спектрометрического детектора «TripleQuard 6440» с системой ионизации «ESI» (Agilent, США), отличающегося источником ионизации масс-спектрометра. Источник ионизации «Agilent Jet Stream – электроспрей» обладает технологией термической фокусировки, что позволяет пятикратно увеличить чувствительность.

Данная модель ВЭЖХ позволяет развивать давление в хроматографической системе до 600 бар, имеет автоматический пробоотборник на 100 образцов с термостатом, позволяющим обеспечить необходимую стабильность образцов. В качестве подвижной фазы использовались растворы формиата аммония на основе деионизованной воды и метанола с добавлением муравьиной кислоты. Для хроматографического разделения биологической смеси на компоненты использовалась обращено-фазовая хроматографическая колонка типа «Poroshell 120 EC-C18 50 мм x 3.0 мм» с размером частиц 2.7 мкм. Наилучшее хроматографическое разделение было достигнуто посредством изократического элюирования подвижной фазы при условиях, указанных в таблице 5.

**Таблица 5. Условия хроматографического разделения**

Параметр	Значение
Скорость потока подвижной фазы	0,4 мл/мин
Объем инъекции	5 мкл
Температура термостата хроматографической колонки	60 <sup>0</sup> С
Время анализа	1,5 мин

Время удерживания эверолимуса при заданных параметрах составило 0,848 (+/-0,001) мин.

В качестве детектора использовался масс-спектрометр типа «тройной квадруполь» с системой ионизации «электроспрей» - «Agilent Jet Stream-электроспрей» (AJS ESI). Качественные масс-хроматограммы были получены при



работе ионного источника в режиме регистрации положительных ионов и режиме мониторинга реакций заданных ионов, при условиях, указанных в таблице 6.

**Таблица 6. Условия работы масс-спектрометрического детектора**

Параметр	Значение
Температура газа	325 <sup>0</sup> С
Скорость потока газа	9 л/мин
Распыление	20 psi
Прекурсор-ион для эверолимуса	975.6
Прекурсор-ион для внутреннего стандарта	979.6
Ион-фрагмент для эверолимуса	908.5
Ион-фрагмент для внутреннего стандарта	912.5
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

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).

Для предварительной обработки цельной крови проводили следующие процедуры: 0,1 мл цельной крови смешивали с 0,2 мл осаждающего реагента (1% сульфат цинка в 80% метаноле), смешивали в течение 10 мин, используя шейкер со скоростью 2400 об/мин, центрифугировали 10 мин со скоростью 6000 об/мин при 4<sup>0</sup>С, затем отбирали 0,1 мл супернатанта, добавляли 0,1 мл метанола, перемешивали 30 сек при помощи шейкера со скоростью 2400 об/мин, после чего центрифугировали 10 мин со скоростью 6000 об/мин при 4<sup>0</sup>С и отбирали 0,120 мл супернатанта в стеклянную вialу для хроматографического анализа.

Калибровочные и контрольные образцы в интервале концентраций от 1 до 20 нг/мл готовили из цельной донорской крови путем смешивания одинакового

количества концентрированных растворов эверолимуса в метаноле с образцами крови, предварительно внеся рабочий раствор внутреннего стандарта. Растворы готовили непосредственно перед проведением измерений. Далее все калибровочные и контрольные образцы подвергались предварительной подготовке проб.

Обработка данных проводилась с использованием программ качественного и количественного анализа Mass Hunter B 07.00 (Agilent Technologies).

Тестирование аналитической методики на пригодность к использованию в клинической практике проводили согласно международным требованиям к валидации биоаналитических методик и правилами проведения исследования биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, и включало в себя оценку пригодности хроматографического разделения, установление пределов количественного обнаружения, оценку линейности, контроль селективности метода, оценку воспроизводимости, расчет прецизионности, проведение межлабораторных сличительных испытаний.

Количественное определение эверолимуса в пробах пациентов иммунохимическим методом проводилось с использованием иммунохимического анализатора Abbott «Architect i2000» (рис. 4) и тест-систем фирмы QMS Everolimus/Thermo Scientific.



*Рисунок 4. Иммунохимический анализатор Abbott «Architect i2000».*

Тест-система QMS® Everolimus предназначена для определения концентрации эверолимуса в образцах цельной крови человека на автоматизированных анализаторах клинической химии. Полученные результаты используются в качестве вспомогательного средства при ведении пациентов с трансплантацией почек и печени, получающих терапию эверолимусом.

Анализ QMS Everolimus представляет собой турбидиметрический иммуноанализ с использованием гомогенных частиц. Анализ основан на конкуренции между лекарственным средством в образце и лекарственным средством, нанесенным на микрочастицу, за участки связывания антител реагента "эверолимус-антитело". Реагент с микрочастицами, покрытыми эверолимусом, быстро агглютинируется в присутствии реагента с антителами к эверолимусу и в отсутствие какого-либо конкурирующего лекарственного средства в образце. Скорость изменения поглощения измеряется фотометрически. При добавлении образца, содержащего эверолимус, реакция агглютинации частично ингибируется, замедляя скорость изменения поглощения. Максимальная скорость агглютинации наблюдается при самой низкой концентрации эверолимуса, а самая низкая скоростью агглютинации - при самой высокой концентрации эверолимуса.

Тест-система QMS Everolimus представлена набором жидких реагентов, готовых к использованию и включает в себя 3 реагента. Реагент №1 представлен IgM (антисыворотка), сывороточным альбумином человека, поликлональными антителами к эверолимусу и азидом натрия. Реагент №2 содержит микрочастицы, покрытые эверолимусом и азид натрия. Третий реагент (реагент для осаждения) содержит сульфат меди и азид натрия.

Методика выполнения процедуры количественного определения включала в себя следующие этапы: все реагенты тщательно перемешивали, избегая образования пузырьков, проводили пробоподготовку калибровочных (6 уровней концентраций в диапазоне от 1 до 20 нг/мл), контрольных образцов (2 контрольные точки) и проб пациентов, затем производили измерения и калибровку прибора, согласно руководству по эксплуатации. Пробоподготовка проб включала в себя добавление к всем исследуемым образцам (300 мкл)

метанола (350 мкл) и осаждающего агента (50 мкл). Пробы тщательно перемешивали при помощи лабораторного вортекса 35 сек. и центрифугировали 8 мин. (13,400 g). После центрифугирования отбирали надосадочную жидкость в ёмкости для образцов и устанавливали на борт прибора. Незамедлительно проводились калибровка прибора и анализ образцов при длине волны 700 нм.

Сравнительная оценка лабораторной информативности выполнялась согласно рекомендациям руководства «Сравнение методов и оценка аналитического смещения с использованием образцов пациентов», предложенного Национальным комитетом по разработке клинических и лабораторных стандартов. В этом документе рассматривается алгоритм определения смещения между двумя лабораторными методами и дизайн эксперимента сравнения методов с использованием образцов пациентов. Рекомендуемый протокол эксперимента подразумевает наличие двух лабораторных методов исследования, среди которых один является тестируемым, другой – эталонным. Хроматографический метод для проведения терапевтического лекарственного мониторинга является прямым методом исследования, принцип которого заключается в определении конкретной молекулы вещества. Кроме того, высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием признана «золотым стандартом» для проведения терапевтического лекарственного мониторинга в мировых лабораториях. Иммунохимический метод – «косвенный» лабораторный метод исследования, который допускает определенную погрешность измерения за счет кросс-реактивности метаболитов, т. к. действующим принципом выступает взаимодействие антигена с антителом. Данный факт обуславливает выбор эталонным методом ВЭЖХ-МС/МС.

Для набора данных, согласно рекомендациям NCCLS, необходимо проанализировать не менее 40 образцов пациентов с искомым аналитом тестируемым и эталонным методом. Все пробы должны быть измерены каждым методом дважды. Эксперимент должен проводиться в течение не менее 5 рабочих дней. В наше исследование были включены 50 образцов. Для исследования концентрации эверолимуса забиралась цельная кровь в пробирки типа Vacutainer с

наполнителем КЗ-ЭДТА. Все образцы цельной крови были забраны утром перед приемом следующей дозы эверолимуса. Двукратно измеряли остаточную концентрацию препарата иммунохимическим методом и хроматографическим методом с использованием модифицированной валидированной биоаналитической методики определения концентрации эверолимуса в образцах цельной крови человека. Пробы были проанализированы в течение 10 дней. В период проведения эксперимента ежедневно выполнялся надлежащий контроль качества. Все результаты в дальнейшем были зарегистрированы в базе данных и подвергались статистической обработке согласно алгоритму, представленному в руководстве.

## **2.5 Статистические и математические методы**

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 STATISTIKA (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  $p < 0,05$ . Величина коэффициента корреляции интерпретировалась согласно таблице 7.

**Таблица 7. Интерпретация коэффициента корреляции**

<b>Значение коэффициента корреляции</b>	<b>Интерпретация (сила связи)</b>
0 – 0,3	Очень слабая
0,3 – 0,5	Слабая
0,5 – 0,7	Средняя
0,7 – 0,9	Высокая
0,9 – 1	Очень высокая
Отрицательное значение	Отрицательная обратная связь с аналогичной градацией силы

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1 Результаты валидации модифицированной аналитической методики определения концентрации эверолимуса в образцах цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Для проведения валидации модифицированной методики количественного определения эверолимуса в образцах цельной крови реципиентов сердечного трансплантата методом ВЭЖХ-МС/МС проводили исследование аналитических сигналов с детектора лабораторно-инструментального комплекса в условиях автоматической регистрации и оценивали соответствие полученных результатов международным требованиям к валидации биоаналитических методик.

Для оценки приемлемости разработанного протокола хроматографического разделения оценивали число теоретических тарелок и коэффициент асимметрии пика. Предложенная аналитическая методика определения концентрации эверолимуса в образцах цельной крови человека методом ВЭЖХ – МС/МС отвечает критериям приемлемости (табл. 8).

**Таблица 8. Сопоставление параметров предложенной аналитической методики определения эверолимуса в цельной крови и требований руководства по валидации биоаналитических методик.**

Параметр	Полученное значение	Требуемое значение
Число теоретических тарелок	4100 +/- 500	Более 2000
Коэффициент асимметрии пика	1.66 +/- 0.14	Не больше 2.0

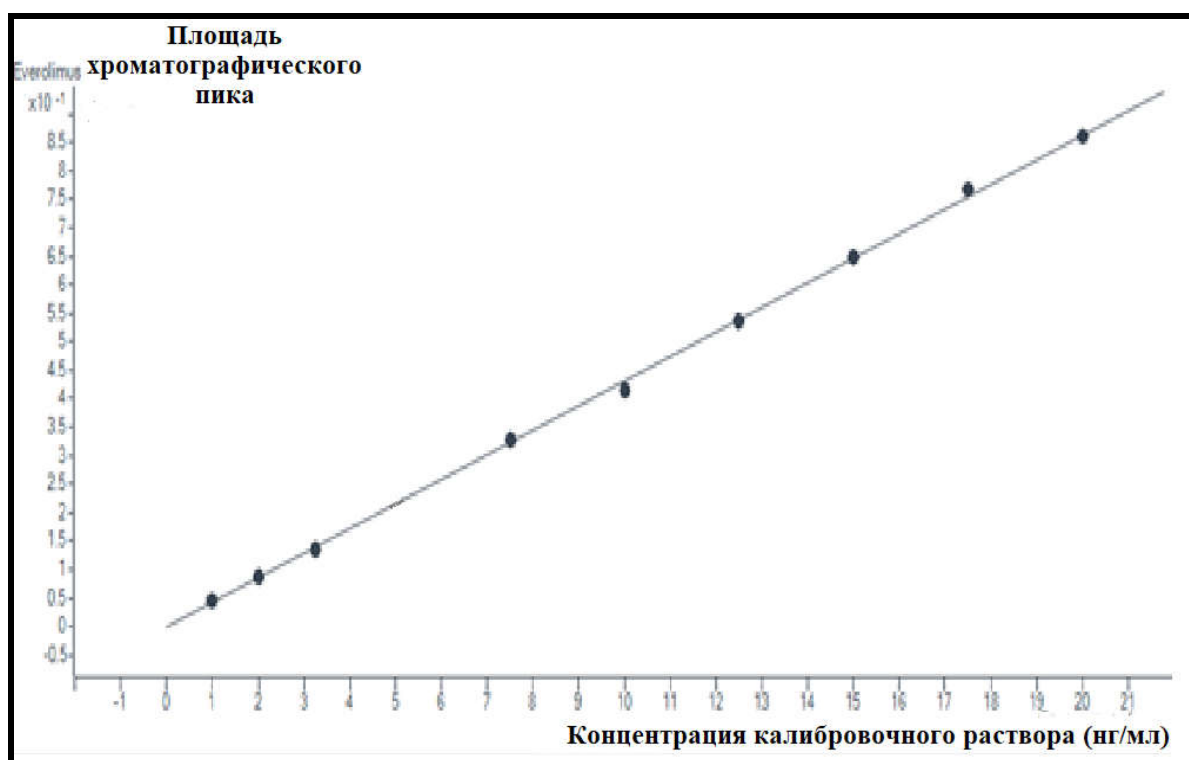
Время удерживания эверолимуса при заданных параметрах составило -  $0.848 \pm 0.001$  мин.

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 3-8 нг/мл (рис. 3). Калибровочная кривая была построена на 9 калибровочных стандартных образцах (рис. 3), при минимально необходимых 6. Коэффициент

детерминации составил ( $R^2$ ) – 0,999. Масс-хроматограммы калибровочных образцов продемонстрированы на рисунках 6 и 7. Результаты измерения калибровочных образцов отображены в таблице 9.

**Таблица 9. Результаты измерения калибровочных образцов.**

Образец, №	Целевая концентрация, нг/мл	Время удерживания, мин.	Площадь пика, ус. ед.	Точность, %	Отклонение, %
1	1	0,845	32	103,6	3,6
2	2	0,845	51	91,0	9
3	3,25	0,848	89	104,6	4,6
4	7,5	0,849	163	99,2	0,8
5	10	0,846	229	101,0	1
6	12,5	0,847	316	103,5	3,5
7	15	0,848	324	96,0	4
8	17,5	0,845	483	103,4	3,4
9	20	0,848	518	97,6	2,4

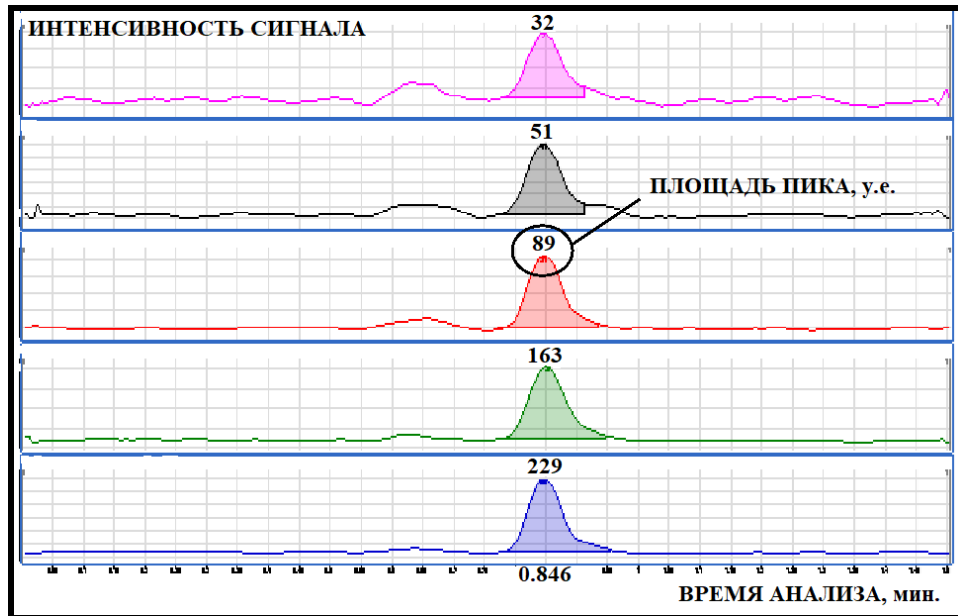


**Рисунок 5. Калибровочная кривая для эверолимуса в диапазоне концентраций от 1 до 20 нг/мл.**

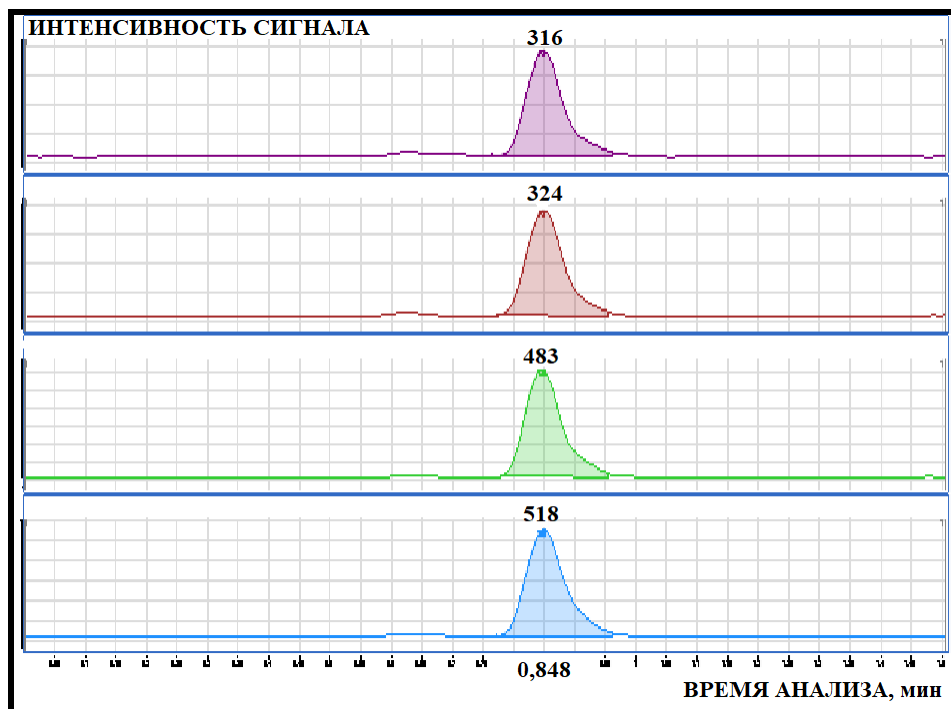
Линейность калибровочной кривой признана удовлетворительной на основании того, что отклонение нижнего предела количественного определения от теоретической концентрации составило 3,6%, что укладывается в критерий



приемлемости – не более 20%, отклонение полученных концентраций всех стандартов (кроме НПКО) от теоретической концентрации не превысило 15% (от 0,8% до 9%).



**Рисунок 6. 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 7. Масс-хроматограммы калибровочных образцов (концентрация эверолимуса в образцах – 12,5 нг/мл, 15 нг/мл, 17,5 нг/мл, 20 нг/мл).**

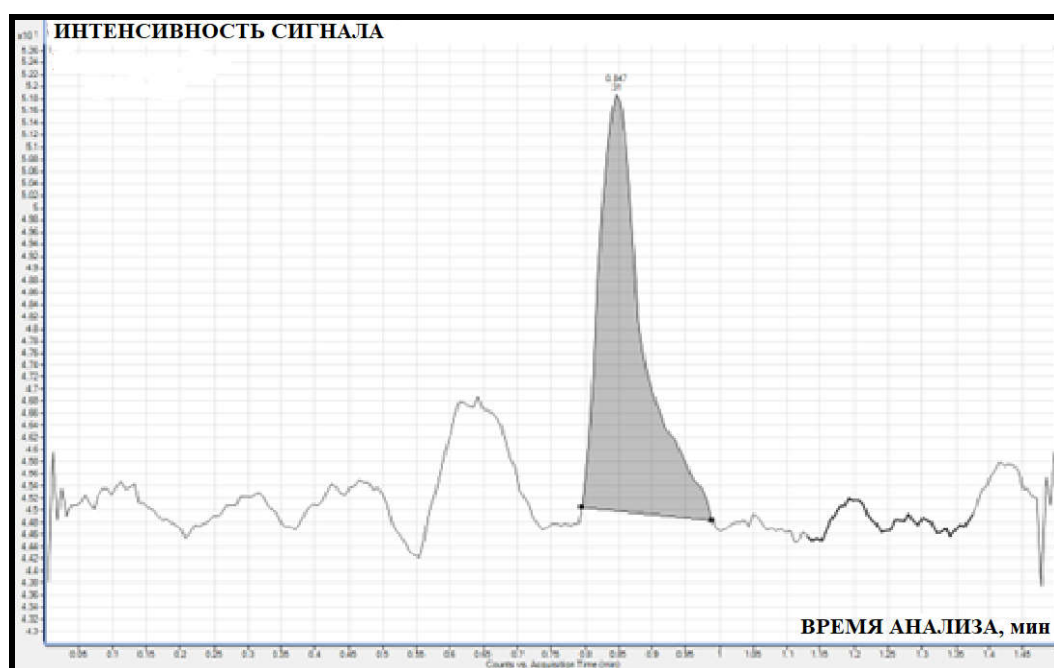
Нижний предел количественного обнаружения (аналитическая чувствительность) для предложенной методики составил – 1 нг/мл. Аналит в

данной концентрации определяется в виде узкого симметричного пика с соотношением сигнал: шум не менее 10:1 (рис.8), что также удовлетворяет лабораторным требованиям.

Отклонение результатов исследования стандартов нижнего предела количественного обнаружения (НПКО) от целевой концентрации не превышало 20%, что удовлетворяет требованиям к чувствительности биоаналитических методик (табл. 10).

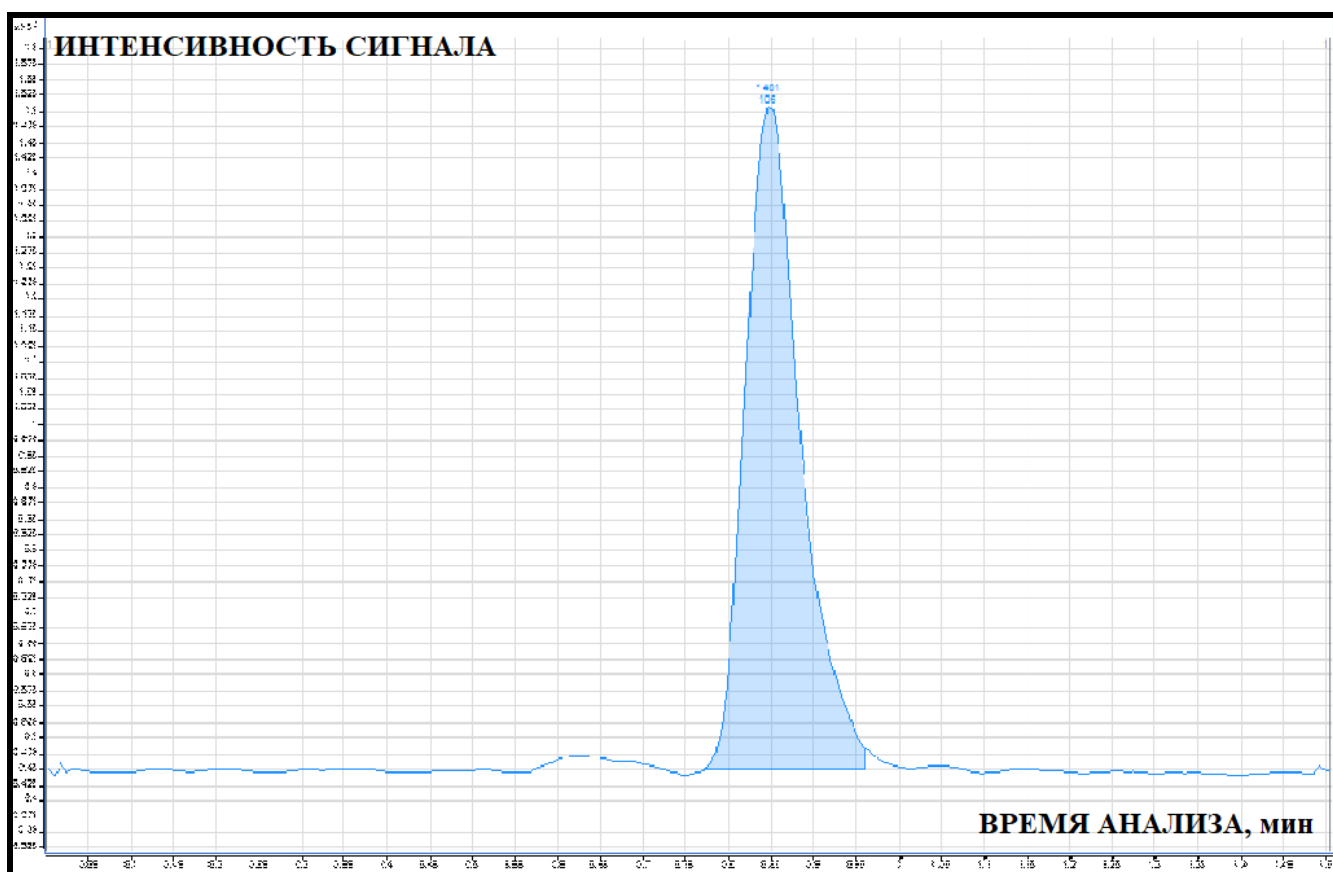
**Таблица 10. Отклонение результатов исследования стандартов НПКО от целевой концентрации**

П/П образец	Целевая концентрация	Результат	Отклонение, %
1	1 нг/мл	1,15 нг/мл	15
2	1 нг/мл	0,99 нг/мл	1
3	1 нг/мл	0.84 нг/мл	16
4	1 нг/мл	1,1 нг/мл	10
5	1 нг/мл	1,09 нг/мл	9



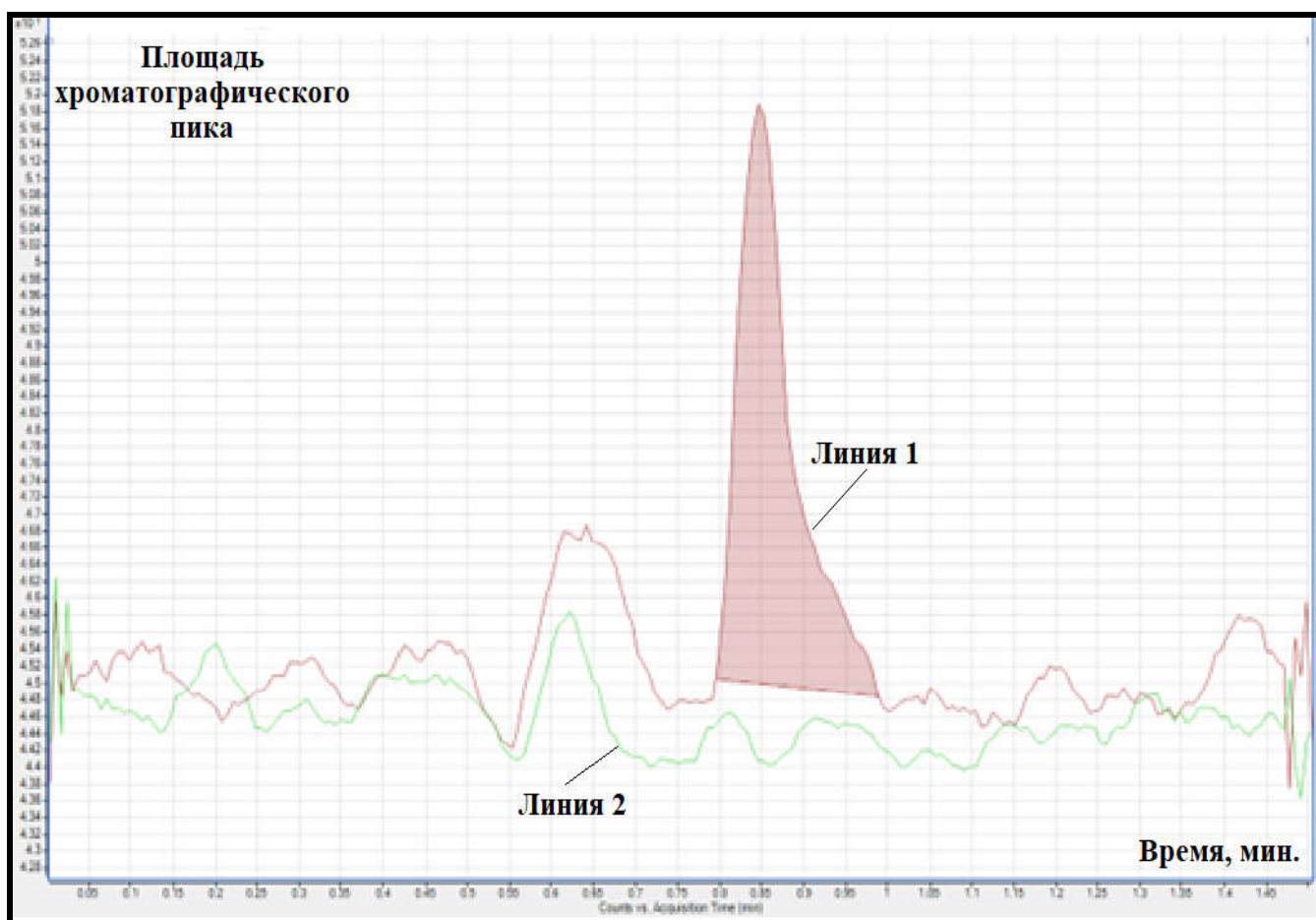
**Рисунок 8. Масс-хроматограмма стандартного образца с концентрацией эверолимуса, соответствующей НПКО (1 нг/мл).**

Верхний предел количественного обнаружения – 20 нг/мл. Аналит в данной концентрации определяются в виде узкого симметричного пика (рис. 9).



**Рисунок 9. Масс-хроматограмма калибровочного образца с концентрацией эверолимуса 20 нг/мл.**

Оценка селективности методики проводилась путем исследования донорской крови, забранной от шести здоровых доноров, не принимающих эверолимус. Образцы донорской крови подвергались пробоподготовке и анализу согласно вышеописанному модифицированному протоколу. Так как в результате анализа на масс-хроматограммах не обнаружены пики при установленных параметрах сканирования ионов с отношением сигнал:шум, превышающим 3:1, контроль селективности методики признан приемлемыми, а сопоставление масс-хроматограмм интактной крови и крови, содержащей эверолимус в концентрации 1 нг/мл, что соответствует нижнему пределу количественного обнаружения, позволяет сделать вывод о специфичности методики (рис. 10). Было подтверждено отсутствие потенциально мешающих веществ, поскольку площади их пиков не превышали 20% от значения площади пика стандартного образца, соответствующего нижнему пределу количественного обнаружения (аналитическая чувствительность).



**Рисунок 10. Масс-хроматограмма стандартного образца с концентрацией эверолимуса, соответствующей НПКО (1 нг/мл) – линия 1, наложенной на масс-хроматограмму отрицательной контрольной пробы – линия 2.**

Контроль воспроизводимости методики проводили на цельной донорской крови, содержащей массовые концентрации эверолимуса, соответствующие низкому, среднему и высокому уровню измерений. Результаты контроля воспроизводимости методики продемонстрированы в таблице 11.

**Таблица 11. Результаты контроля воспроизводимости методики**

Контрольный образец	Целевая концентрация, нг/мл	Результат, нг/мл	Точность, %
№1 – 1е измерение	1 нг/мл	1,1 нг/мл	110
№1 – 2е измерение	1 нг/мл	0,95 нг/мл	95
№1 – 3е измерение	1 нг/мл	0,86 нг/мл	86
№1 – 4е измерение	1 нг/мл	1,08 нг/мл	108
№1 – 5е измерение	1 нг/мл	0,98 нг/мл	98
№2 – 1е измерение	3 нг/мл	3,05 нг/мл	102

Продолжение таблицы 11			
№2 – 2е измерение	3 нг/мл	3,2 нг/мл	106
№2 – 3е измерение	3 нг/мл	2,97 нг/мл	90
№2 – 4е измерение	3 нг/мл	2,89 нг/мл	96
№2 – 5е измерение	3 нг/мл	3,15 нг/мл	105
№3 – 1е измерение	10 нг/мл	10,3 нг/мл	103
№3 – 2е измерение	10 нг/мл	9,8 нг/мл	98
№3 – 3е измерение	10 нг/мл	9,2 нг/мл	92
№3 – 4е измерение	10 нг/мл	10,1 нг/мл	101
№3 – 5е измерение	10 нг/мл	10,9 нг/мл	109
№4 – 1е измерение	20 нг/мл	19,2 нг/мл	96
№4 – 2е измерение	20 нг/мл	19,9 нг/мл	99,5
№4 – 3е измерение	20 нг/мл	20,3 нг/мл	101,5
№4 – 4е измерение	20 нг/мл	20,1 нг/мл	100,5
№4 – 5е измерение	20 нг/мл	20,7 нг/мл	103,5

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. 12) 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 (табл. 13).

**Таблица 12. Результаты измерения контрольных образцов для расчета прецизионности**

Контрольный образец	Целевая концентрация, нг/мл	Результат, нг/мл	Точность, %
№1 – 1е измерение	1 нг/мл	0,90	90
№1 – 2е измерение	1 нг/мл	1,10	110
№1 – 3е измерение	1 нг/мл	1,09	109
№1 – 4е измерение	1 нг/мл	0,85	85
№1 – 5е измерение	1 нг/мл	0,95	95
№2 – 1е измерение	2 нг/мл	2,10	105
№2 – 2е измерение	2 нг/мл	1,90	95
№2 – 3е измерение	2 нг/мл	1,89	94,5
№2 – 4е измерение	2 нг/мл	2,15	107,5
№2 – 5е измерение	2 нг/мл	2,09	104,5

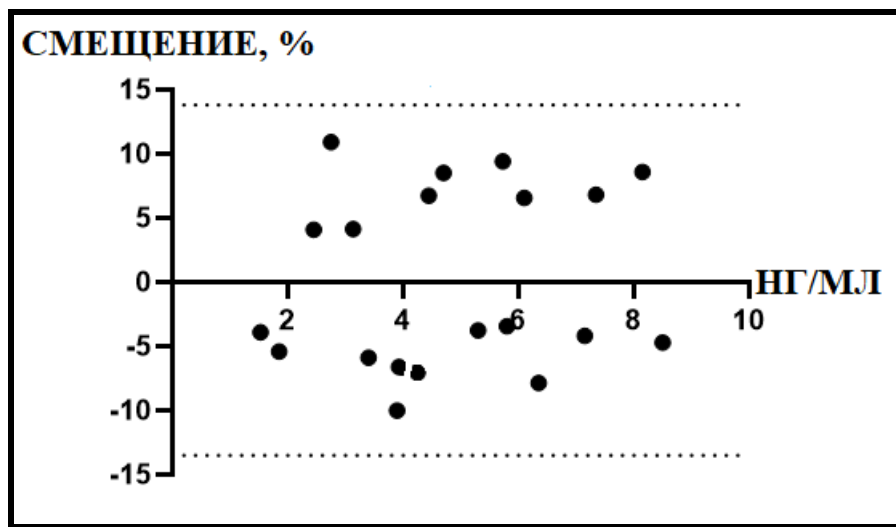
Продолжение таблицы 12			
№3 – 1е измерение	5 нг/мл	5,00	100
№3 – 2е измерение	5 нг/мл	4,90	98
№3 – 3е измерение	5 нг/мл	4,25	85
№3 – 4е измерение	5 нг/мл	5,04	100,8
№3 – 5е измерение	5 нг/мл	5,20	104
№4 – 1е измерение	7,5 нг/мл	7,10	94,6
№4 – 2е измерение	7,5 нг/мл	7,30	97,3
№4 – 3е измерение	7,5 нг/мл	7,60	101,3
№4 – 4е измерение	7,5 нг/мл	7,49	99,8
№4 – 5е измерение	7,5 нг/мл	7,55	100,6
№5 – 4е измерение	20 нг/мл	20,5	102,5
№5 – 4е измерение	20 нг/мл	19,8	99
№5 – 4е измерение	20 нг/мл	19,3	96,5
№1 – 5е измерение	20 нг/мл	20,8	104
№1 – 5е измерение	20 нг/мл	20,9	104,5

**Таблица 13. 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%, что соответствует требованиям к параметрам валидации биоаналитических методик [130].

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. 11).



**Рисунок 11.** Демонстрация относительного смещения между результатами количественного определения эверолимуса в крови пациентов, выполненного методом ВЭЖХ-МС/МС в ЦКДЛ ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МР и в НИЛ токсикологии и лекарственного мониторинга НИО биоиндикации ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России.

Показатели внедренной методики не уступают таковым для аналогичной методики, внедренной на другой клинической базе.

Модифицированный протокол измерения концентрации эверолимуса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием был успешно внедрен в клиническую и лабораторную практику ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, апробирован на 348 образцах цельной крови пациентов, принимающих эверолимус в составе базовой поддерживающей

комбинированной иммуносупрессивной терапии у реципиентов сердца с целью профилактики отторжения, и продемонстрировала хорошие результаты внешнего контроля качества (примеры масс-хроматограмм пациентов приведены в приложении 1).

### **3.2 Сравнительная оценка лабораторной информативности иммунохимического метода и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием при верификации осложнений иммуносупрессивной терапии эверолимусом у пациентов после трансплантации сердца.**

Для проведения исследования лабораторной информативности согласно рекомендациям CLSI EP9-A2-IR «Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples» было проанализировано 50 образцов иммунохимическим методом и методов ВЭЖХ-МС/МС. Результаты испытаний представлены в таблице 14.

**Таблица 14. Результаты сравнительных измерений проб цельной крови пациентов, принимающих эверолимус иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС**

№ П/П	ИХ, нг/мл	ВЭЖХ-МС/МС, нг/мл	Среднее значение, нг/мл	Абсолютная разница, нг/мл	Относительная разница, %
1	8,58	5,2	6,89	3,38	39,4
2	8,33	3,95	6,14	4,38	52,6
3	5,6	4,2	4,90	1,4	25,0
4	6,45	4,3	5,38	2,15	33,3
5	5,53	3,28	4,41	2,25	40,7
6	5,53	5,39	5,46	0,14	2,5
7	6,5	3,79	5,15	2,71	41,7
8	8,33	3,95	6,14	4,38	52,6
9	8,06	4,5	6,28	3,56	44,2
10	8,69	4,67	6,68	4,02	46,3
11	8,1	3,8	5,95	4,3	53,1
12	8,24	5,3	6,77	2,94	35,7
13	5,61	4,2	4,91	1,41	25,1
14	5,79	5,0	5,40	0,79	13,6
15	7,86	5,45	6,66	2,41	30,7
16	4,54	3,45	4,00	1,09	24,0



Продолжение таблицы 14					
17	4,37	3,2	3,79	1,17	26,8
18	7,05	3,32	5,19	3,73	52,9
19	5,1	3,76	4,43	1,34	26,3
20	4,99	4,06	4,53	0,93	18,6
21	4,1	3,0	3,55	1,1	26,8
22	7,58	4,65	6,12	2,93	38,7
23	7,13	3,18	5,16	3,95	55,4
24	6,25	5,8	6,03	0,45	7,2
25	5,17	4,7	4,94	0,47	9,1
26	4,52	4,2	4,36	0,32	7,1
27	7,97	3,91	5,94	4,06	50,9
28	3,33	4,34	3,84	-1,01	-30,3
29	4,12	3,39	3,76	0,73	17,7
30	5,23	4,65	4,94	0,58	11,1
31	5,0	3,78	4,39	1,22	24,4
32	6,62	4,8	5,71	1,82	27,5
33	4,9	4,0	4,45	0,9	18,4
34	5,11	3,31	4,21	1,8	35,2
35	4,08	4,09	4,09	-0,01	-0,2
36	5,48	3,7	4,59	1,78	32,5
37	7,89	4,9	6,40	2,99	37,9
38	3,37	3,16	3,27	0,21	6,2
39	4,82	3,4	4,11	1,42	29,5
40	5,37	3,7	4,54	1,67	31,1
41	5,96	4,5	5,23	1,46	24,5
42	6,2	4,5	5,35	1,7	27,4
43	6,7	5,2	5,95	1,5	22,4
44	7,3	5,4	6,35	1,9	26,0
45	6,1	4,99	5,55	1,11	18,2
46	4,8	3,6	4,20	1,2	25,0
47	4,16	2,89	3,53	1,27	30,5
48	4,5	2,6	3,55	1,9	42,2
49	2,37	2,0	2,19	0,37	15,6
50	2,0	1,14	1,57	0,86	43,0

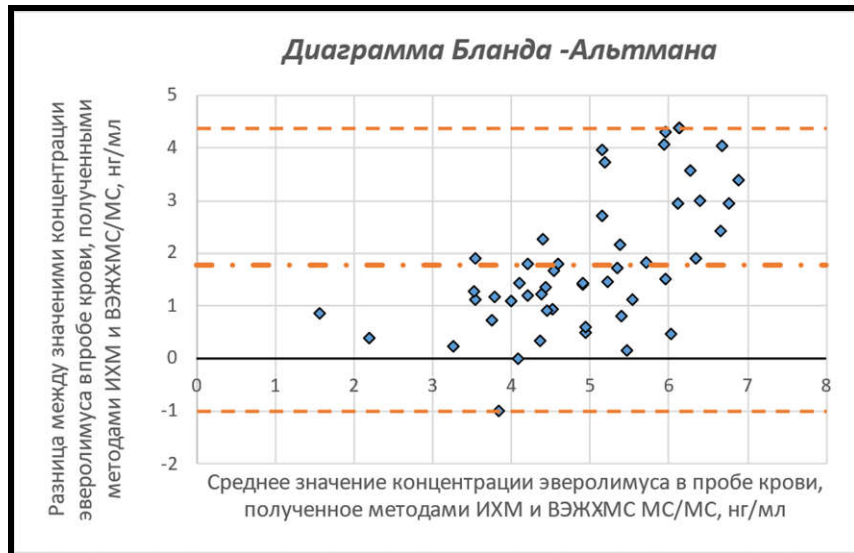
Из 50 образцов, исследованных иммунохимическим методом, 2 пробы содержали концентрацию эверолимуса ниже терапевтического интервала (3,0 нг/мл), концентрация эверолимуса в 41 пробе находилась в терапевтическом диапазоне (3,0-8,0 нг/мл), и в 7 образцах концентрация эверолимуса была выше верхнего предела терапевтического интервала (8,0 нг/мл). Минимальная

концентрация в выборке составила – 2,0 нг/мл, максимальная – 8,69 нг/мл, средняя концентрация всех образцов - 5,82 нг/мл.

Из 50 образцов, исследованных методом ВЭЖХ-МС/МС, 4 пробы содержали концентрацию эверолимуса ниже терапевтического интервала (3,0 нг/мл), концентрация эверолимуса в 46 образцах находилась в терапевтическом диапазоне (3,0-8,0 нг/мл), и концентрация эверолимуса выше верхнего предела терапевтического интервала (8,0 нг/мл) не была обнаружена ни в одном образце. минимальная концентрация в выборке составила – 1,14 нг/мл, максимальная – 5,45 нг/мл, средняя концентрация всех образцов - 4,04 нг/мл.

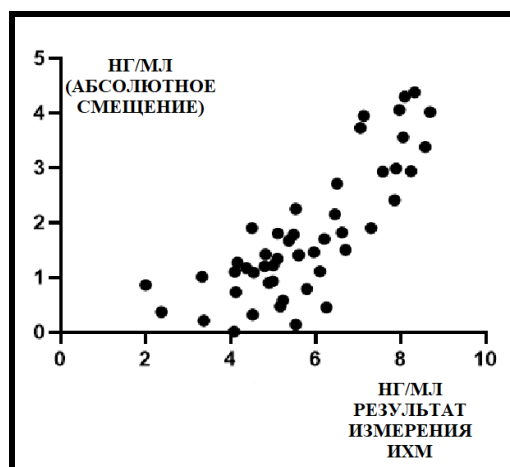
Стоит обратить внимание на пробы №1 и №2, результат измерения иммунохимическим методом которых выходит за пределы верхнего уровня терапевтического коридора и мог повлечь за собой назначение более низкой дозировки, что не требуется согласно результатам, полученным методом ВЭЖХ-МС/МС. Подобная клиническая ситуация могла сложиться у пациентов, сдавших пробы №47 и №48, результат которых находится в пределах терапевтического окна и не требует изменения дозировки препарата. Результат проб №47 и №48, полученный методом ВЭЖХ-МС/МС требует повышения дозировки эверолимуса, т.к. полученная концентрация ниже нижнего уровня терапевтического интервала. Неправильно принятое решение в этих случаях могло привести к развитию острого отторжения или увеличению рисков развития БКАПС.

Затем при помощи программы GraphPad Prism 9.5.1 был произведен расчет смещения (Bias), как показателя, рекомендованного вышеуказанным документом. Результаты оценки смещения показателей концентрации при измерении эверолимуса иммунохимическим методом и методом ВЭЖХ-МС/МС представлены на рисунке 12.



**Рисунок 12. Диаграмма Бланда-Альтмана (график соответствия) для иммунохимического метода и ВЭЖХ-МС/МС в приложении к количественному определению эверолимуса.**

Показатели смещения варьируют от 0,01 нг/мл ( $B_{\text{slow}}$ ) до 4,38 нг/мл ( $B_{\text{high}}$ ). Средний показатель смещения составил – 1,82 нг/мл. 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. 13).

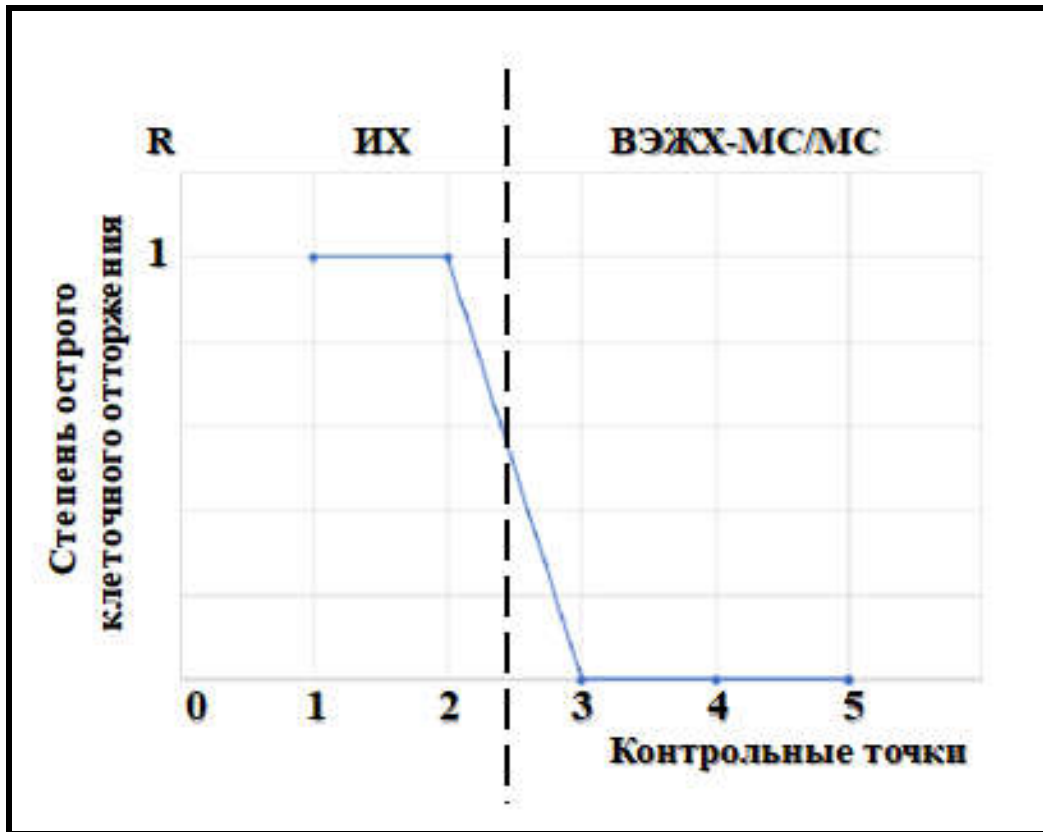


**Рисунок 13. Корреляционная зависимость концентраций эверолимуса, измеренных ИХМ и показателями смещения результатов между ИХМ и ВЭЖХ-МС/МС.**

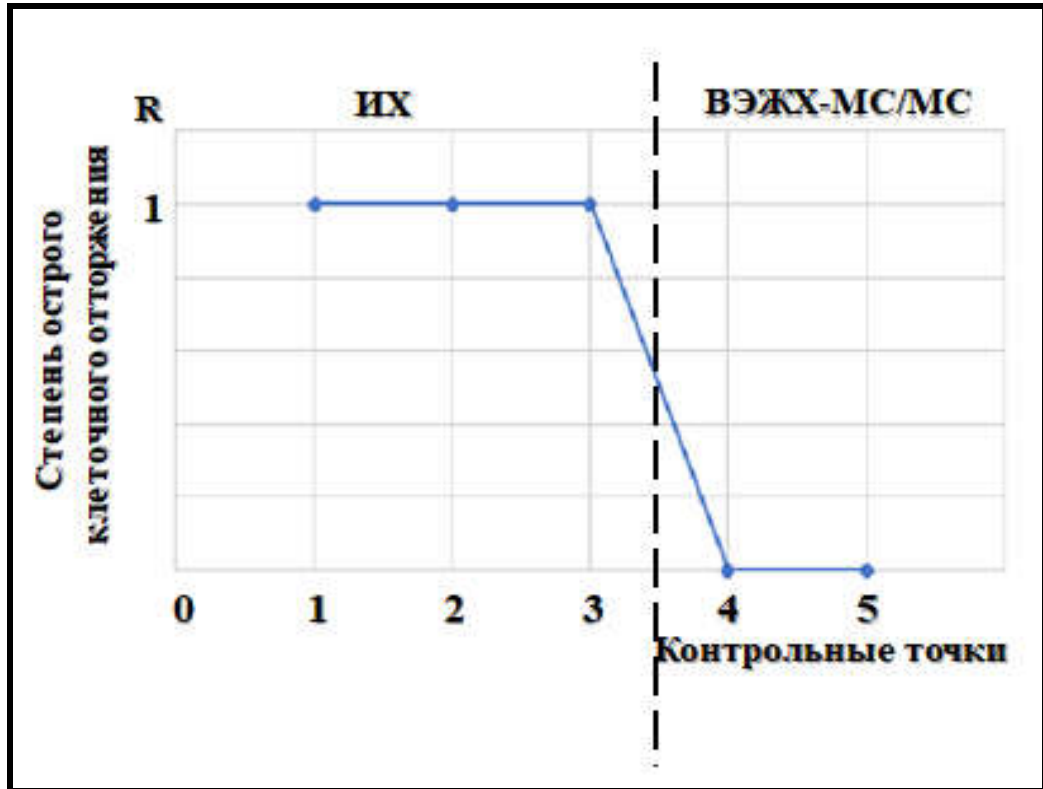
### **3.3 Результаты сравнительной оценки клинической информативности иммунохимического метода и ВЭЖХ-МС/МС при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца.**

#### **3.3.1 Сравнительный анализ развития острого клеточного и антителоопосредованного отторжения сердечного трансплантата в период ТЛМ эверолимуса иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС**

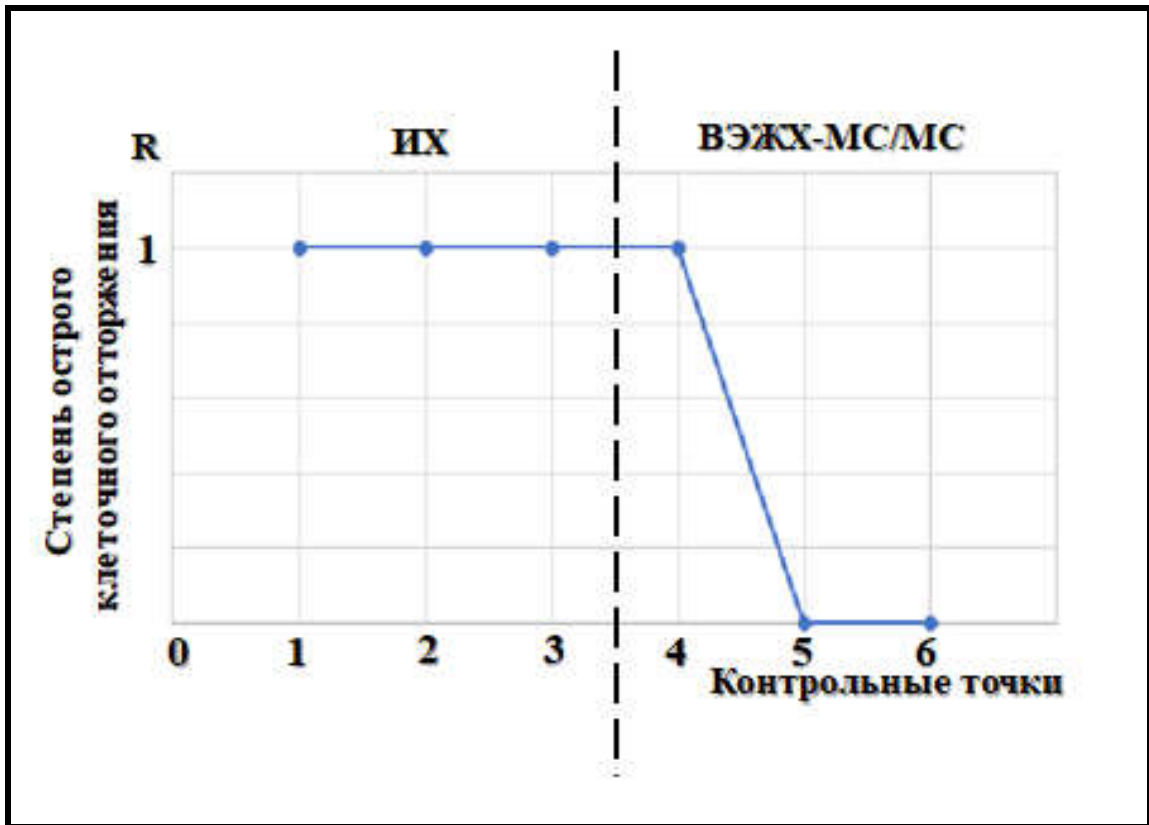
С целью диагностики острого клеточного и антителоопосредованного отторжения сердечного трансплантата всем реципиентам проводилось морфологическое исследование биоптатов миокарда, полученных при проведении плановых (1 раз в год) и внеплановых (по показаниям) коронарографических исследований. За весь период наблюдения было выполнено 101 гистологическое исследование, из которых 49 - в период использования иммунохимического метода для проведения ТЛМ эверолимуса, 52 – в период использования ВЭЖХ-МС/МС. По результатам исследования биоптатов, острое клеточное или антителоопосредованное отторжение было обнаружено у 10 пациентов из 15. Результаты каждого пациента в динамике представлены на рисунках 14–23. 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. 24). 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.



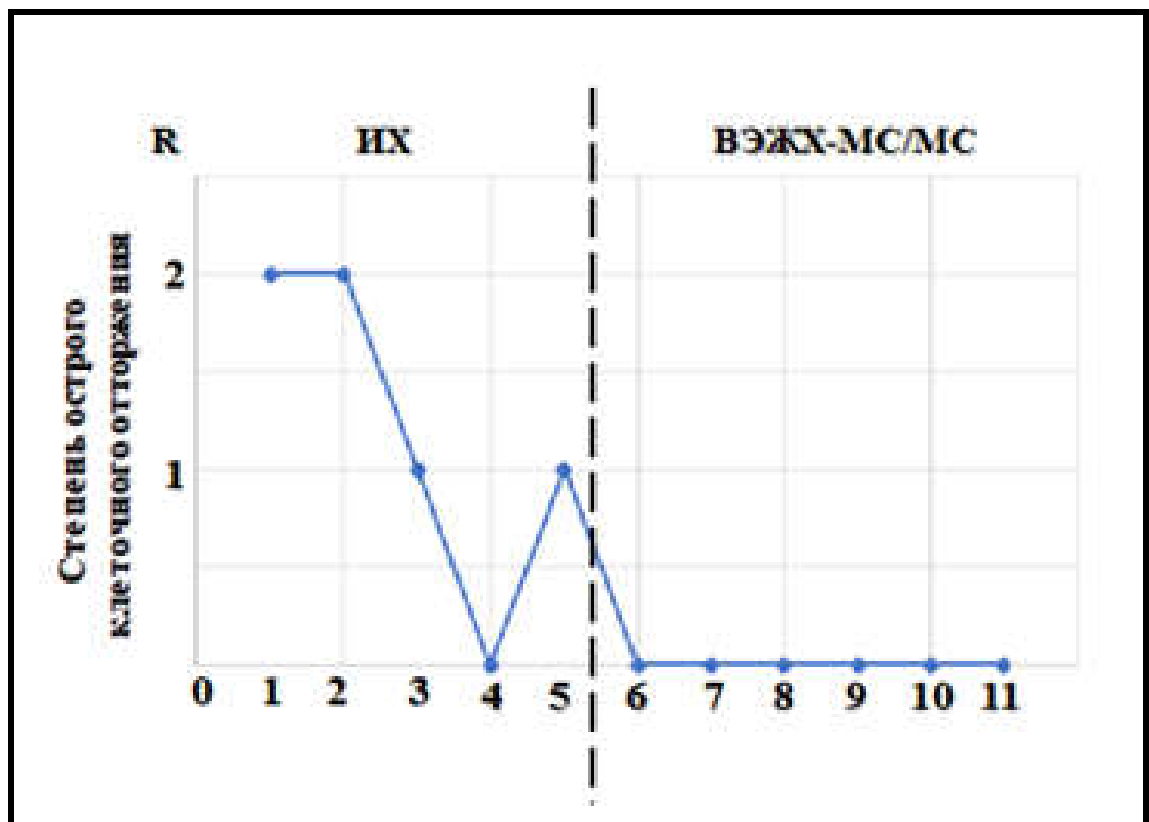
*Рисунок 14. Пациент 2. Результаты ЭМБ. Динамика изменений степени острого клеточного отторжения.*



*Рисунок 15. Пациент 4. Результаты ЭМБ. Динамика изменений степени острого клеточного отторжения.*



*Рисунок 16. Пациент 5. Результаты ЭМБ. Динамика изменений степени острого клеточного отторжения.*



*Рисунок 17. Пациент 6. Результаты ЭМБ. Динамика изменений степени острого клеточного отторжения.*

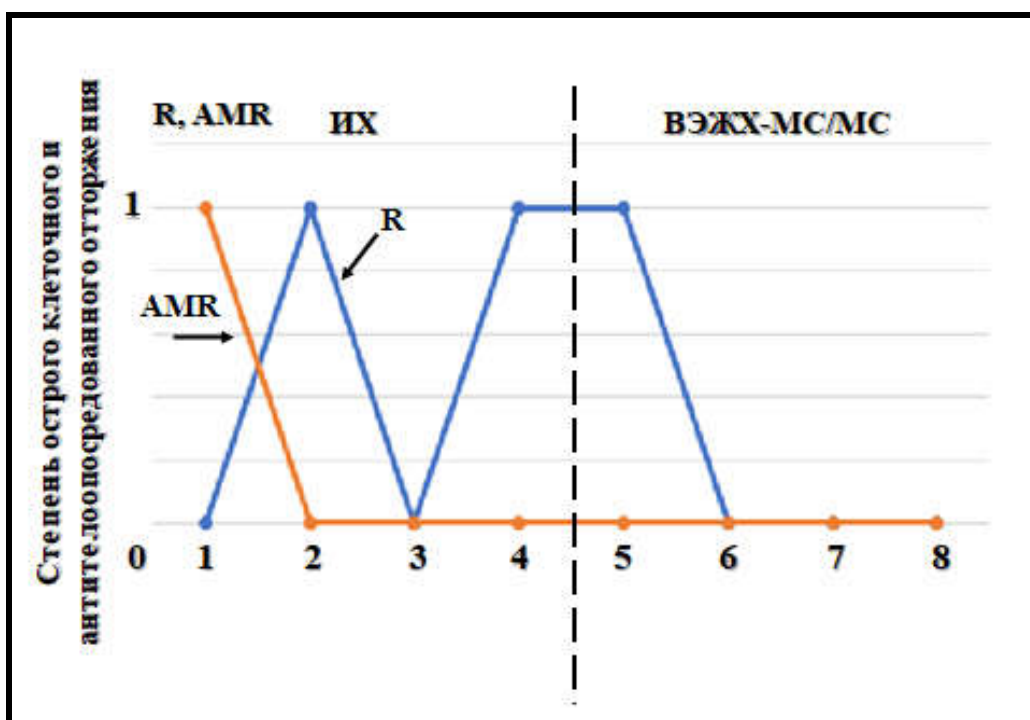


Рисунок 18. Пациент 8. Результаты ЭМБ. Динамика изменений степени острого клеточного отторжения (отражена синим цветом) и антителоопосредованного отторжения (отражена оранжевым цветом).

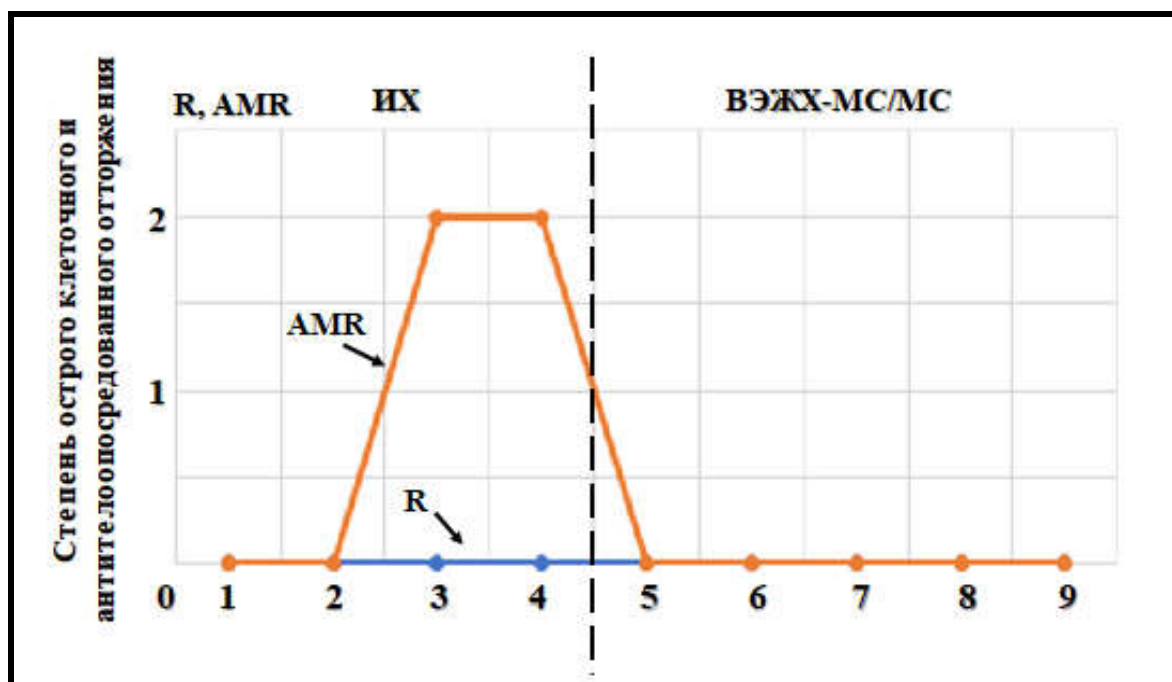


Рисунок 19. Пациент 11. Результаты ЭМБ. Динамика изменений степени острого клеточного отторжения (отражена синим цветом) и антителоопосредованного отторжения (отражена оранжевым цветом).

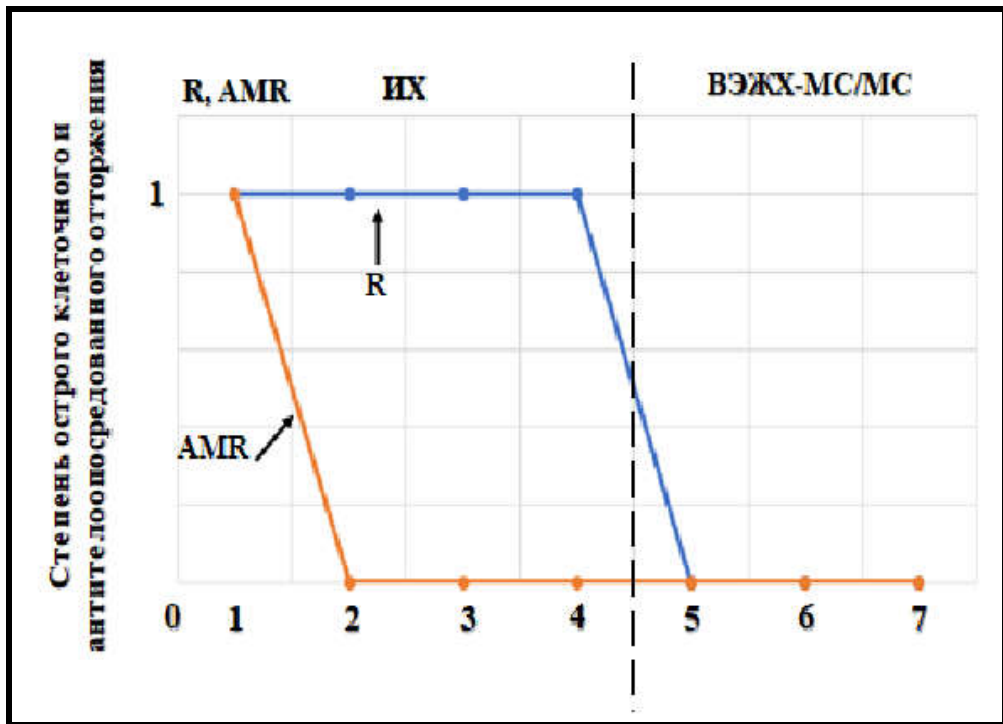


Рисунок 20. Пациент 12. Результаты ЭМБ. Динамика изменений степени острого клеточного отторжения (отражена синим цветом) и антителоопосредованного отторжения (отражена оранжевым цветом).

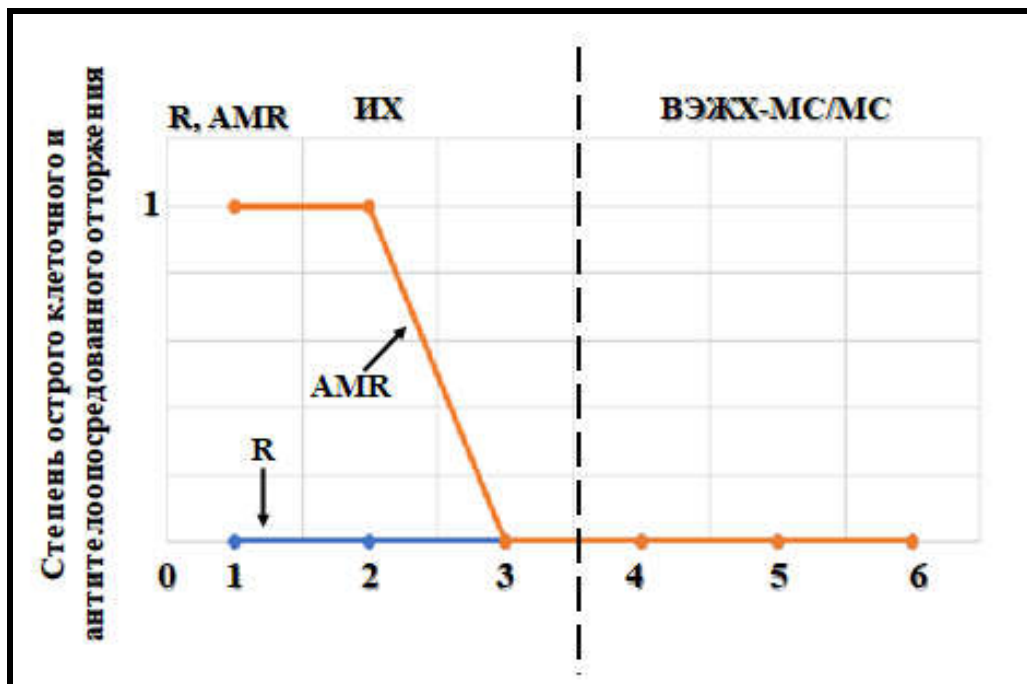


Рисунок 21. Пациент 13. Результаты ЭМБ. Динамика изменений степени острого клеточного отторжения (отражена синим цветом) и антителоопосредованного отторжения (отражена оранжевым цветом).



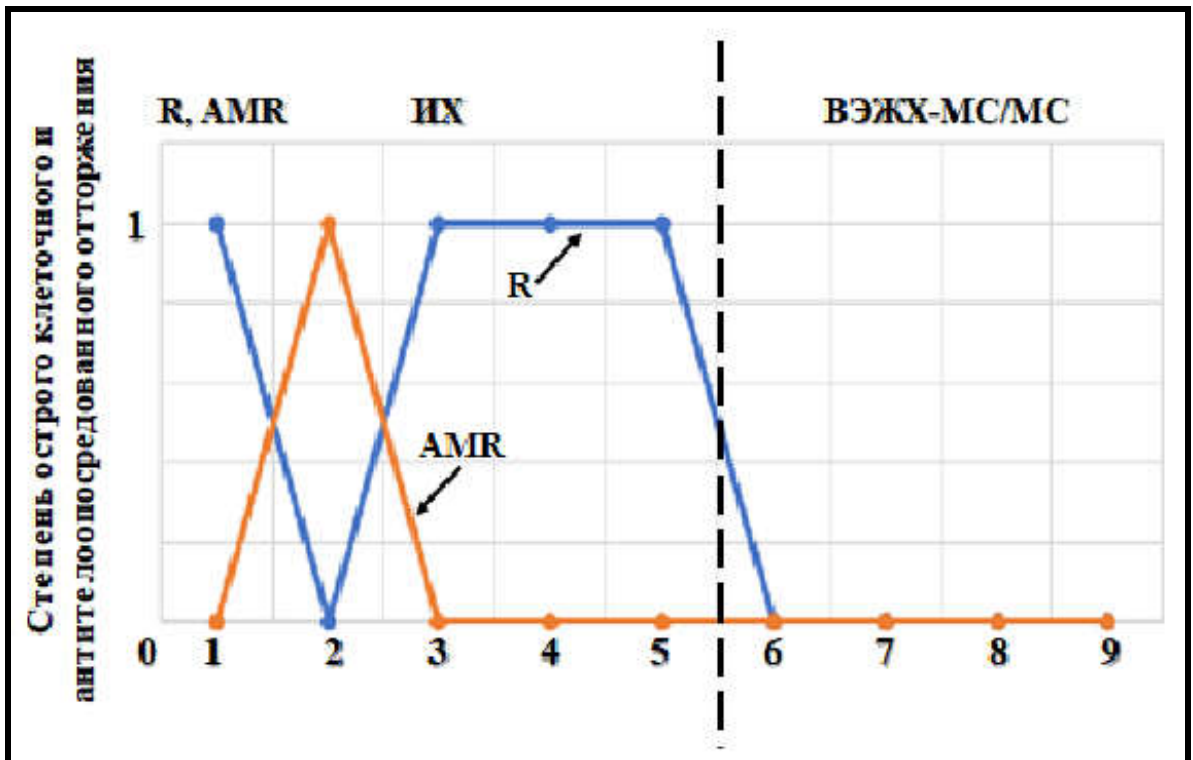


Рисунок 22. Пациент 14. Результаты ЭМБ. Динамика изменений степени острого клеточного отторжения (отражена синим цветом) и антителоопосредованного отторжения (отражена оранжевым цветом).

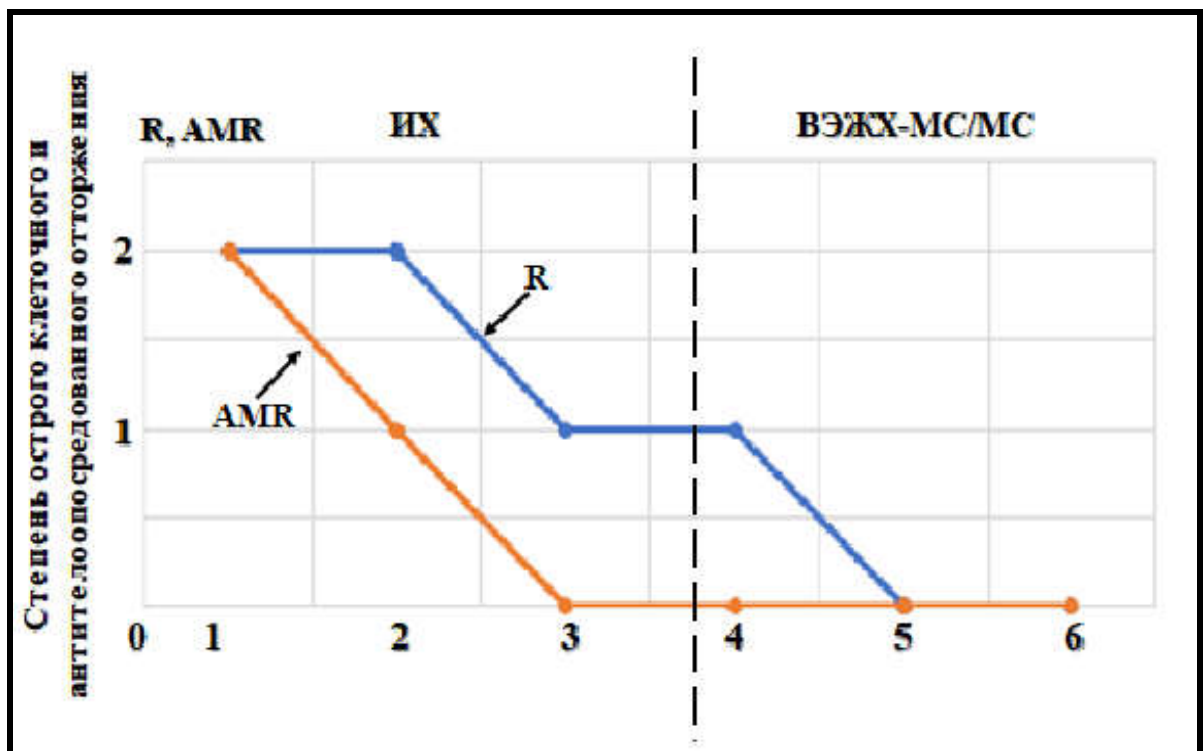
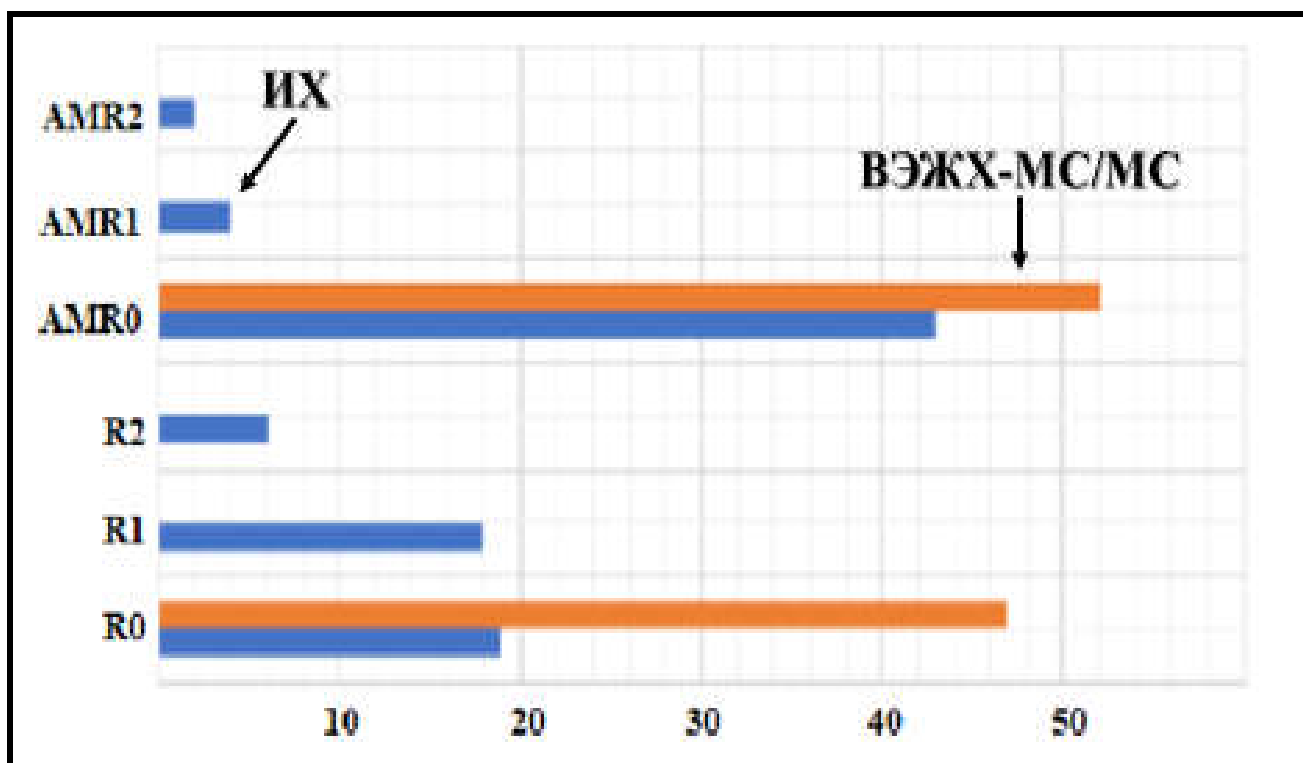


Рисунок 23. Пациент 15. Результаты ЭМБ. Динамика изменений степени острого клеточного отторжения (отражена синим цветом) и антителоопосредованного отторжения (отражена оранжевым цветом).



*Рисунок 24. Результаты ЭМБ в исследуемой группе за весь период наблюдения.*

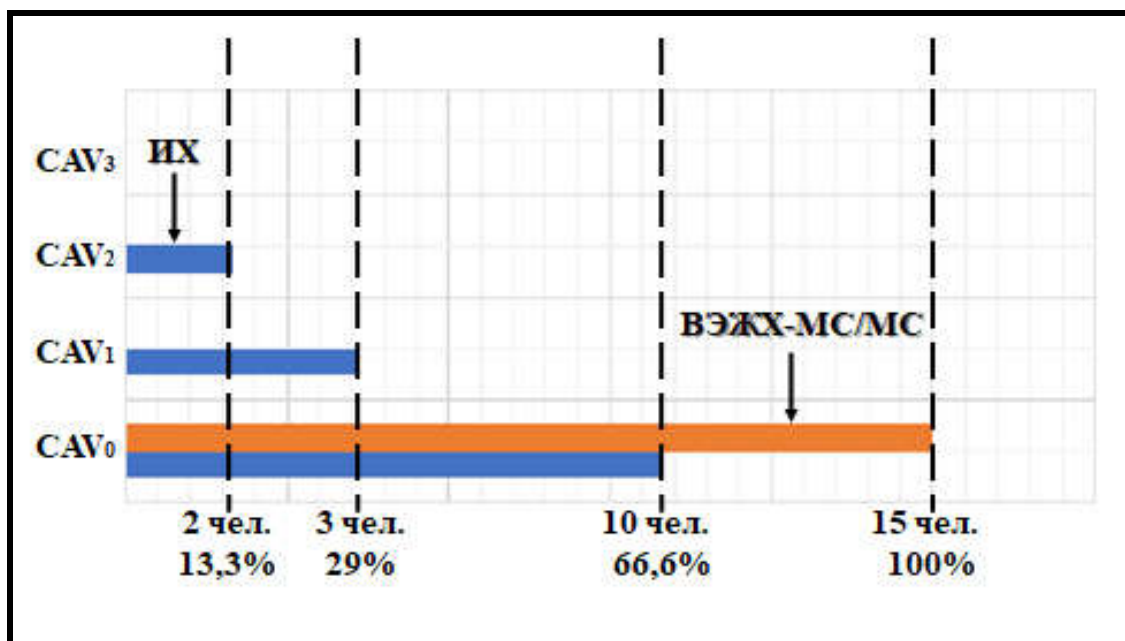
### 3.3.2 Сравнительная оценка прогрессирования болезни коронарных артерий пересаженного сердца при проведении терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и методом ВЭЖХ-МС/МС

Одной из значимых проблем у пациентов после пересадки сердца является развитие болезни коронарных артерий пересаженного сердца. С целью раннего выявления и дальнейшей вторичной профилактики тяжелого течения заболевания всем пациентам, включенным в исследование, проводилось ангиографическое исследование коронарных артерий, результаты которого представлены в таблице 15 и на рисунке 25.

*Таблица 15. Динамика прогрессирования васкулопатии сердечного трансплантата и необходимость реваскуляризации миокарда при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС.*

Степень поражения коронарных артерий (n/%)	ИХ, n=15 n/%	ВЭЖХ, n=15 n/%	Достоверность различий, P
CAV <sub>0</sub>	10	15	p<0.001

Продолжение таблицы 15			
CAV <sub>1</sub>	3 (20%)	0	p<0.001
CAV <sub>2</sub>	2 (13.3%)	0	p<0.001
CAV <sub>3</sub>	0	0	P=1.0
CAV <sub>1-3</sub>	5 (33.3%)	0	p<0.001
ЧКВ (n/%)	2	0	p<0.001

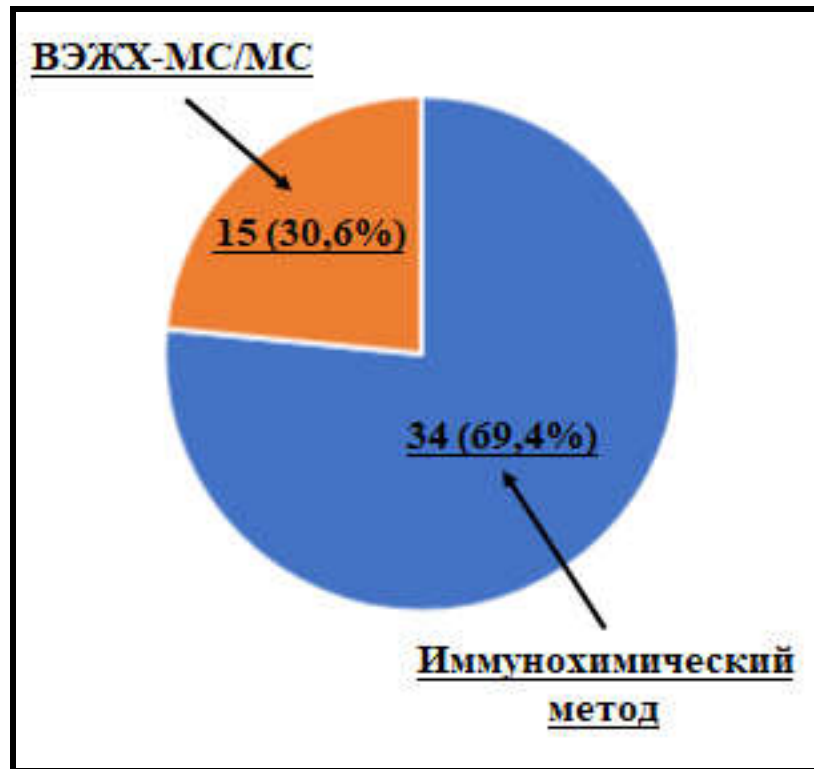


**Рисунок 25. Степень тяжести патологических изменений коронарных артерий у пациентов, включенных в исследование при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС.**

Как видно из таблицы 15, выявлено достоверное различие в динамике возникновения и течения болезни коронарных артерий пересаженного сердца в период проведения ТЛМ эверолимуса иммунохимическим методом и методом 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 патологических изменений коронарного русла при болезни коронарных артерий пересаженного сердца, 2 реципиентам сердечного трансплантата потребовалось чрескожное коронарное вмешательство с постановкой стента.

### 3.3.3 Сравнительный анализ развития инфекционных осложнений у реципиентов сердца, принимающих эверолимус при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и методом ВЭЖХ-МС/МС

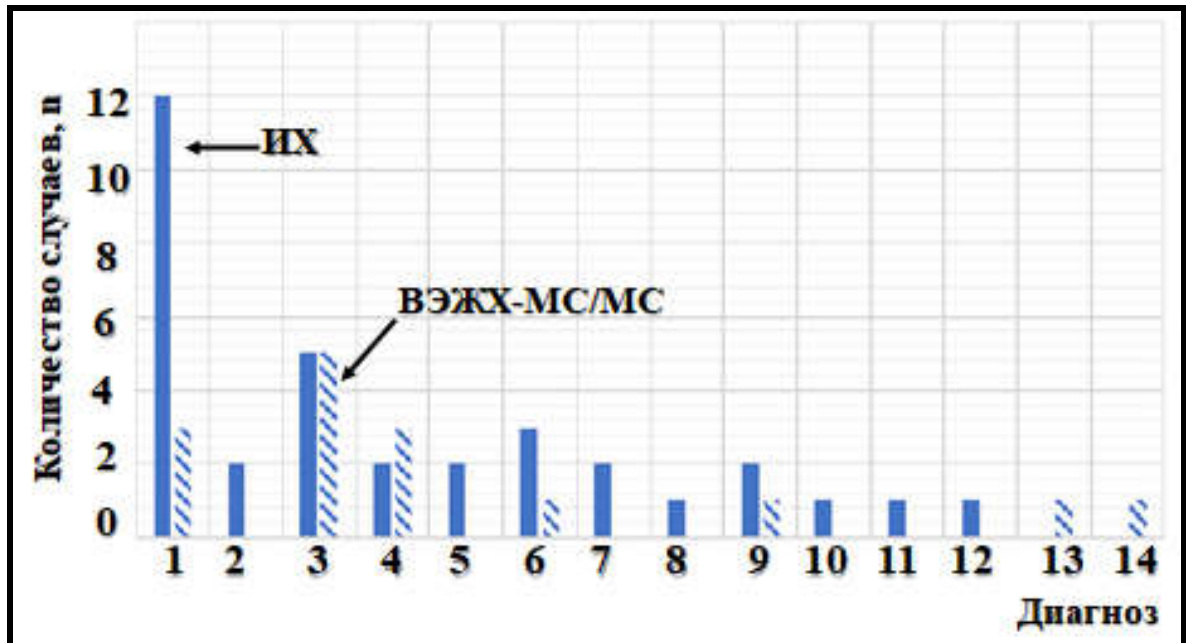
За весь период исследования у всех пациентов было зафиксировано 49 случаев инфекционных заболеваний, из них 34 случая (69,4%) – в период проведения ТЛМ эверолимуса иммунохимическим методом, и 15 (30,6%) – в период внедрения ВЭЖХ-МС/МС, что в 2,3 раза меньше (рис. 24).



*Рисунок 26. Распределение частоты возникновения инфекционных заболеваний у реципиентов сердца, принимающих эверолимус при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и методом ВЭЖХ-МС/МС.*

Наиболее распространенным инфекционным заболеванием в оба периода наблюдения стали внебольничная пневмония и хронический бронхит (обострение). Заболевания, зафиксированные только в период использования иммунохимического метода для ТЛМ эверолимуса: внутрибольничная пневмония – 2 случая, опоясывающий герпес – 2 случая, острый гайморит – 2 случая, острый бактериальный фарингит – 1 случай, инфекция кровотока – 1 случай, микоз пищевода – 1 случай, дисбиоз кишечника – 1 случай. Заболевания,

зафиксированные только в период использования ВЭЖХ-МС/МС для ТЛМ эверолимуса: острый ларингит – 1 случай, острый бактериальный конъюнктивит – 1 случай (рис. 27).



**Рисунок 27.** Характер и количество инфекционных заболеваний у реципиентов сердца, принимающих эверолимус при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и методом ВЭЖХ-МС/МС (1 – внебольничная пневмония, 2 – внутрибольничная пневмония, 3 – хронический бронхит, 4 – ОРВИ, 5 – опоясывающий герпес, 6 – острый синусит, 7 – острый гайморит, 8 – острый бактериальный фарингит, 9 – острый цистит, 10 – инфекция кровотока, 11 – микоз пищевода, 12 – дисбиоз кишечника, 13 – острый ларингит, 14 – острый бактериальный конъюнктивит).

### 3.3.4 Анализ развития дислипидемии в исследуемых группах

При оценке клинической информативности лабораторных методов фармакокинетического 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, триглицеридов и коэффициента атерогенности (табл. 16, табл.17, табл. 18), в период проведения использования ВЭЖХ-МС/МС, однако

многофакторная зависимость данных показателей требует более детального исследования на большей выборке больных.

**Таблица 16. Уровень общего холестерина (ммоль/л) у пациентов исследуемой группы при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС**

Пациент, п/п			Достоверность различий, Р
	ИХ	ВЭЖХ	
1	7,56±0,44	6,32±0,55	Р = 0,0006
2	3,91±0,49	3,9±0,04	
3	5,9±0,73	4,8±0,46	
4	4,8±0,5	3,94±0,67	
5	5,3±0,41	4,74±0,09	
6	4,5±0,45	4,13±0,17	
7	6,5±0,33	5,2±0,07	
8	4,9±0,51	4,2±0,23	
9	6,38±0,03	5,13±0,12	
10	4,71±0,24	4,69±0,32	
11	4,37±0,17	3,9±0,29	
12	6,02±1,13	5,03±0,19	
13	4,66±0,30	4,49±0,21	
14	4,79±0,36	4,58±0,4	
15	4,6±0,4	3,7±0,25	

**Таблица 17. Уровень триглицеридов (ммоль/л) у пациентов исследуемой группы при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС**

Пациент, п/п			Достоверность различий, Р
	ИХ	ВЭЖХ	
1	2,28±0,31	2,22±0,5	Р<0,05
2	2,75±1,71	2,29±1,13	
3	2,40±1,07	1,74±0,27	
4	1,15±0,35	1,065±0,09	
5	0,78±0,06	0,69±0,157	
6	1,19±1,72	0,96±0,03	
7	3,01±1,5	2,8±0,12	
8	1,65±0,58	1,26±0,25	
9	1,72±0,33	1,37±0,31	
10	2,64±0,45	1,21±0,51	
11	1,53±0,20	1,32±0,24	
12	1,26±0,09	1,45±0,47	
13	0,87±0,29	0,8±0,07	

Продолжение таблицы 17		
14	1,05±0,3	1,13±0,03
15	1,19±0,3	0,93±0,04

**Таблица 18. Уровень коэффициента атерогенности у пациентов исследуемой группы при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС**

Пациент, п/п			Достоверность различий, Р
	ИХ	ВЭЖХ	
1	5,69±0,78	5,48±0,04	Р<0,05
2	2,06±0,42	2,18±0,26	
3	2,18±0,79	2,16±0,05	
4	2,27±0,21	1,5±0,3	
5	1,09±0,13	1,1±0,09	
6	1,45±0,05	1,49±0,13	
7	5,0±1,33	5,0±0,45	
8	2,87±0,44	2,6±0,13	
9	3,98±1,3	2,31±0,21	
10	3,57±1,1	3,38±0,09	
11	2,69±0,09	2,97±0,65	
12	2,65±0,43	2,7±0,25	
13	1,26±0,32	1,57±0,01	
14	3,45±0,7	3,16±0,31	
15	1,28±0,32	1,6±0,16	

### 3.3.5 Сравнительная оценка показателей гемограммы у пациентов исследуемой группы при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС

Достоверных различий по показателям гематологической токсичности в двух группах выявлено не было.

**Таблица 19. Количество эритроцитов у пациентов исследуемой группы при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС**

Пациент, п/п			Достоверность различий, Р
	ИХ	ВЭЖХ	
1	5,39±0,64	5,45±0,69	Р>0,05
2	4,40±0,66	4,95±0,82	
3	5,15±0,81	5,32±0,70	
4	5,03±0,65	4,90±0,76	

Продолжение таблицы 19		
5	4,62±0,74	4,83±0,81
6	5,35±0,84	4,39±0,68
7	4,37±0,67	4,46±0,85
8	4,36±0,70	5,27±0,78
9	5,21±0,69	5,31±0,72
10	5,18±0,83	4,20±0,75
11	4,80±0,71	4,57±0,80
12	5,55±0,76	4,39±0,74
13	5,33±0,65	4,88±0,72
14	5,42±0,87	5,31±0,70
15	4,86±0,63	4,07±0,82

**Таблица 20. Уровень гемоглобина у пациентов исследуемой группы при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС**

Пациент, п/п			Достоверность различий, Р
	ИХ	ВЭЖХ	
1	156±8,8	131±6,0	Р>0,05
2	121±9,1	146±9,8	
3	154±9,7	138±5,0	
4	147±6,0	142±9,1	
5	129±10,0	139±6,6	
6	134±5,1	157±8,4	
7	124±9,2	126±9,6	
8	155±5,3	153±9,7	
9	137±8,3	123±7,5	
10	140±9,6	158±5,6	
11	136±8,2	130±7,9	
12	134±8,2	144±5,3	
13	117±8,0	129±8,3	
14	142±9,0	126±5,1	
15	153±9,8	137±8,5	

**Таблица 21. Уровень лейкоцитов у пациентов исследуемой группы при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС**

Пациент, п/п			Достоверность различий, Р
	ИХ	ВЭЖХ	
1	5,3±1,9	6,3±1,7	Р>0,05
2	8,1±2,2	7,9±1,8	
3	5,9±2,0	8,8±2,0	



Продолжение таблицы 21		
4	6,0±1,7	7,0±1,2
5	4,9±2,1	6,6±1,5
6	8,7±1,5	6,5±1,0
7	8,3±1,8	4,9±1,6
8	4,5±0,75	8,6±1,4
9	5,4±1,3	6,3±2,2
10	7,1±1,6	9,1±2,0
11	6,7±1,9	8,1±1,3
12	7,9±2,1	9,8±0,9
13	7,0±1,8	7,4±1,5
14	9,9±2,0	4,5±2,1
15	6,3±0,97	9,6±1,4

**Таблица 22. Уровень тромбоцитов у пациентов исследуемой группы при выполнении фармакокинетического мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС**

Пациент, п/п	ИХ	ВЭЖХ	Достоверность различий, Р
1	275±11,9	249±49,3	P>0,05
2	302±32,7	317±25,0	
3	188±28,7	182±17,1	
4	280±38,9	203±18,5	
5	201±11,4	212±39,9	
6	181±19,1	203±36,6	
7	215±48,5	221±47,9	
8	194±37,3	205±32,1	
9	320±13,1	312±20,5	
10	297±34,7	279±33,1	
11	278±12,2	205±24,9	
12	290±21,9	223±35,5	
13	259±30,3	310±45,0	
14	236±17,5	198±16,6	
15	221±42,9	206±14,3	

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Терапевтический лекарственный мониторинг – лабораторное направление, занимающееся контролем фармакологической терапии у пациентов высокого риска лекарственных осложнений [66]. К такой группе пациентов относятся больные, получающие иммуносупрессивную терапию. Особое место в структуре иммуносупрессивной терапии занимает ингибитор пролиферативного сигнала эверолимус.

Свою репутацию препарат заслужил благодаря ряду положительных качеств, отличающих его от других препаратов, среди которых антионкогенный эффект, противовирусная активность, благоприятный прогноз по сосудистому ремоделированию [84, 68, 122]. В большинстве работ, посвященных клиническому применению препарата, отражаются механизмы иммуносупрессивного действия [85, 62, 139], демонстрируются наиболее значимые побочные эффекты [61, 124], обсуждаются положительные стороны включения препарата в протокол иммуносупрессивной терапии [20, 82]. Значительная часть работ описывает опыт применения эверолимуса у пациентов после трансплантации почки и/или печени.

В представленном диссертационном исследовании впервые продемонстрирован опыт применения эверолимуса у реципиентов сердца. Подобная группа пациентов стала получать эверолимус с 2016г., когда препарат был отражен в клинических рекомендациях по ведению пациентов, перенесших пересадку сердца [20].

Препарат обладает фармакокинетическими особенностями, а именно узким терапевтическим коридор, выраженной персонифицированной вариабельностью фармакокинетических параметров, нелинейной зависимостью «доза – концентрация» в крови [131, 128]. Ряд авторов обсуждает проблему поддержания целевой концентрации и уровень целевых значений, как при монотерапии эверолимусом, так и при комбинации с ингибиторами кальциневрина или другими иммуносупрессантами. Значительное внимание уделяется факторам,

влияющим на концентрацию препарата. Раскрываются фармакокинетические характеристики, особенности метаболизма препарата, генетическая предрасположенность к модификации метаболизма, влияние приема пищи, расовой принадлежности, возраста, пола и т. д. [96, 115, 118]. Особое внимание уделяется сопутствующей патологии, играющей одну из важных ролей в успешности иммуносупрессивной терапии.

Такие характеристики делают эверолимус препаратом «критической дозы», т. е. препаратом, для которого характерны выраженные изменения в эффективности и профиле безопасности при небольшом изменении режима дозирования. Данные фармакокинетические характеристики позволили включить эверолимус в перечень лекарственных средств, подлежащих обязательному терапевтическому лекарственному мониторингу [118, 128].

В нашей стране и во всем мире для проведения лабораторного контроля концентраций препаратов используется две лабораторные технологии: иммунохимический анализ и хроматографический метод в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, что отражается во многих обзорах, посвященных проблеме терапевтического лекарственного мониторинга [64, 114]. Данные обзоры обсуждают цель и задачи терапевтического лекарственного мониторинга, группы пациентов, требующих проведения контроля фармакотерапии и группы лекарственных средств, включенных в перечень лекарств, требующих измерения концентрации [108, 90, 138, 102]. Также рассматриваются принципы лабораторных методов мониторинга концентраций, плюсы и минусы каждой технологии с клинической и лабораторной позиции [50, 111, 114, 88].

Авторы научных работ, посвященных методам терапевтического лекарственного мониторинга, отражают вероятную преимущественную достоверность результатов исследований, полученных ВЭЖХ-МС/МС за счет исключения кросс-реактивности метаболитов, утверждают отсутствие сопоставимости результатов исследований иммунохимическим методом и хроматографическим методом в сочетании с тандемной масс-спектрометрией без указания конкретных величин смещения результатов [83, 131, 135].

Представленная научно-исследовательская работа подтверждает данное утверждение авторов, демонстрируя конкретную величину смещения результатов одного метода относительно другого. Данный экспериментальный раздел выполнен согласно руководству «Сравнение методов и оценка аналитического смещения двух лабораторных технологий с использованием образцов пациентов», разработанный Национальным комитетом по клиническим и лабораторным стандартам. По результатам работы получено среднее значение относительного смещения – 29%, которое наблюдается в большую сторону для результатов, полученных иммунохимическим методом. Учитывая принцип каждого исследуемого метода, а именно тот факт, что ВЭЖХ-МС/МС, являясь одним из ведущих методов аналитической химии и обладая одними из максимальных уровней чувствительности и специфичности среди лабораторных методов, выделяет из биологической матрицы и детектируют конкретную молекулу, а иммунохимический метод регистрирует реакцию взаимодействия антиген – антитело, подверженную риску влияния метаболитов основного вещества, можно с большой вероятностью говорить, что смещение обусловлено именно завышением концентраций, определяемых иммунохимическим методом. Также, важно отметить, что исследование показало положительную зависимость величины смещения от концентрации препарата в крови ( $r=0.819$ ): чем выше концентрация препарата в крови, тем больше показатель смещения, что с большой вероятностью объясняется большим количеством метаболитов в крови. Полученные результаты продемонстрировали преимущество ВЭЖХ-МС/МС перед иммунохимическим методом. Представленная часть работы, позволяет рекомендовать ВЭЖХ-МС/МС, как «золотой стандарт» для осуществления фармакокинетического мониторинга эверолимуса у реципиентов сердца. Кроме того, полученные данные могут быть экстраполированы на другие группы пациентов, получающих эверолимус и на другие лекарственные препараты за счет того, что подобное смещение формируется на разнице в принципе методов исследования.

В данных литературы существует указание на наличие смещения между методами, но не оценивалось влияние несопоставимости результатов на клинические результаты лечения [83, 131, 135]. Результаты представленной научно-исследовательской работы демонстрируют достоверное влияние аналитического смещения между методами на риски возникновения осложнений иммуносупрессивной терапии.

Одним из наиболее важных и жизнеугрожающих состояний, выступающих осложнением некачественной иммуносупрессивной терапии, является развитие острого клеточного и антителоопосредованного отторжения [51, 21, 8, 11]. Во многих источниках литературы описывается актуальность данного состояния для больных и указывается на хороший профилактический эффект эверолимуса в отношении данного осложнения у пациентов после пересадки сердца. В большинстве научных исследований внимание уделяется преимущественно наиболее частым проявлениям токсичности препарата, формирующиеся при превышении у пациентов концентраций эверолимуса в крови верхнего уровня терапевтического интервала, а проблема острого клеточного и антителоопосредованного отторжения как результат уменьшения иммуносупрессивного эффекта за счет снижения концентраций эверолимуса в цельной крови ниже нижнего уровня терапевтического интервала не рассмотрена. Кроме того, не было проведено оценки значимости разницы между лабораторными методами терапевтического лекарственного мониторинга на принятие клинического решения при получении результата измерения концентрации эверолимуса на уровне нижнего предела терапевтического интервала, и соответственно на результат иммуносупрессивной терапии.

В выполненном диссертационном исследовании показано влияние смещения между лабораторными методами на частоту возникновения острого клеточного и антителоопосредованного отторжения за 2 года наблюдения для каждого метода. Частота острого клеточного отторжения в период проведения терапевтического лекарственного мониторинга методом ВЭЖХ-МС/МС была в 4,8 раза меньше, чем в период контроля концентраций эверолимуса иммунохимическим методом.

Также показана тенденция к снижению частоты антителоопосредованного отторжения при использовании метода ВЭЖХ-МС/МС.

Болезнь коронарных артерий пересаженного сердца (БКАПС), являясь грозным жизнеугрожающим осложнением посттрансплантационного периода у больных после пересадки сердца, выступает одним из определяющих факторов формирования неблагоприятного прогноза [19, 47]. Причина развития данной патологии лежит в плоскости малоэффективной иммуносупрессивной терапии, качество которой определяется качеством проведения терапевтического лекарственного мониторинга. В данных литературы нет конкретных данных за влияние выбора метода терапевтического лекарственного мониторинга на течение БКАПС.

Сравнительное исследование влияния лабораторных методов терапевтического лекарственного мониторинга на отдаленные результаты лечения позволило обнаружить достоверное ( $p < 0.001$ ) различие в динамике течения болезни коронарных артерий пересаженного сердца в периоды реализации фармакокинетического мониторинга эверолимуса иммунохимическим методом и методом ВЭЖХ-МС/МС, а также отметить большую частоту выполнения чрескожных коронарных вмешательств в последнем.

На третьем этапе исследования была изучена частота и структура инфекционной патологии в период контроля за концентрациями эверолимуса иммунохимическим методом и методом ВЭЖХ-МС/МС, как одной из лидирующих токсических осложнений иммуносупрессивной терапии эверолимуса, неоднократно описанной в литературе. Проведенное научное исследование продемонстрировало в 2,3 раза более высокую частоту возникновения инфекционных осложнений при проведении терапевтического лекарственного мониторинга иммунохимическим методом против инфекционной заболеваемости в период использования ВЭЖХ-МС/МС.

При оценке клинической информативности методов фармакокинетического 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.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В диссертационном исследовании, посвященном клинико-лабораторной оценке методов фармакокинетического мониторинга иммуносупрессивной терапии у реципиентов сердца, получены данные по аналитическому смещению результатов исследования концентрации эверолимуса при измерении иммунохимическим методом и хроматографическим методом в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, а также продемонстрировано влияние данного факта на отдаленные результаты лечения.

В рамках экспериментального исследования по оценке аналитического смещения модифицирована, валидирована и апробирована биоаналитическая методика измерения концентрации эверолимуса в пробах цельной крови реципиентов сердца методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием.

## 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, исключаящий 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.

- б) 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 выполненного диссертационного 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 рекомендуется к использованию 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 модифицированная 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 СОКРАЩЕНИЙ**

АГ – артериальная гипертензия

ВПС – врожденные пороки сердца

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

ГЭРБ – гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь

ДЛ – дислипидемия

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИЛ – интерлейкины

КЭА – клинико-экономический анализ

ЛПВП - липопротеины высокой плотности

НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени

НПКО – нижний предел количественного определения

ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

ОЦК – объем циркулирующей крови

ПИКС – постинфарктный кардиосклероз

РКМП – рестриктивная кардиомиопатия

СИБР – синдром избыточного бактериального роста

СН – сердечная недостаточность

СРБ – С-реактивный белок

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ССО – сердечно-сосудистые осложнения

ТГ – триглицериды

ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг

ТС – трансплантация сердца

ТЭЛА – тромбоэмболия лёгочной артерии

ФК – функциональный класс

ХРБС – хроническая ревматическая болезнь сердца

XCH – хроническая сердечная недостаточность

ЦсА – циклоспорин А

ЭДТА –  $K_3$  – этилендиаминтетрауксусная кислота –  $K_3$

FLI – индекс стеатоза печени

HLA - Human Leukocyte Antigens (человеческие лейкоцитарные антигены)

MHC - major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)

mTOR – мишень рапамицина млекопитающих

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards (Национальный комитет по клиническим и лабораторным стандартам)

NYHA – Нью-Йоркская кардиологическая ассоциация

QMS – медицинская информационная система

R – острое клеточное отторжение

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аллазова, С.С. Иммуносупрессивная терапия как фактор риска посттрансплантационного сахарного диабета / С.С. Аллазова, М.С. Новикова, О.Н. Котенко, [и др.] // Терапевтический архив. – 2020. - № 12. – С. 137–141.
2. Амирова, Р.К. Диагностика паразитарных заболеваний иммунологическими методами / Р.К. Амирова, Р.К. Мирзоева, Ф.Ш. Сиюхова // Евразийский Союз ученых (ЕСУ). – 2019. – 11 (68). – С. 22–25.
3. Арнаудова, К.Ш. Современные серологические и иммунологические тесты для диагностики вирусных заболеваний / К.Ш. Арнаудова, М.Р. Копылова, З.В. Жаркова, [и др.] // Прикаспийский вестник медицины и фармации. – 2022. – Т. 3, № 1. – С. 15–19.
4. Артемова, Е.В. Особенности синтеза, активации и дезактивации глюкокортикоидов. Биологическая роль кортизола в метаболических нарушениях / Е.В. Артемова // Ожирение и метаболизм. – 2017. – 14 (2). – С. 48–52.
5. Бабкина, А.В. Развитие онкологических заболеваний после трансплантации органов / А.В. Бабкина, М.Ш. Хубутия // Трансплантология. – 2022. – 14 (4). – С. 476–487.
6. Багаев, А.В. Контроль качества преаналитического этапа в условиях централизации: методика оценки и контроля величин нестабильности аналитов / А.В. Багаев, С.П. Петров, М.И. Прищепа // Лабораторная служба. – 2016. - № 4. – С. 62–68.
7. Бойцов, С.А. Кардиоваскулярная профилактика 2022. Российские национальные рекомендации / С.А. Бойцов, Н.В. Погосова, А.А. Аншелес, [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2023. – 28 (5). – С. 119–249.

8. Веревкин, А.А. Патоморфологическая и иммунофенотипическая характеристика миокарда при отторжении сердечного трансплантата: дис. ... кандидата медицинских наук: 14.03.02 / Веревкин Александр Александрович; [Место защиты: ФГБОУ ВО «КГМУ» МЗ РФ]. – Краснодар, 2021. – 137 с.
9. Ганцев, Ш.Х. Ранняя иммунохимическая диагностика рака. Прототип метода / Ш.Х. Ганцев, А.И. Пухаленко, А.А. Романюха, [и др.] // Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. – 2019. - № 3. – С. 58–62.
10. Глянцев, С.П. Феномен Демихова. В Институте им. Склифосовского (1960–1986 гг.). С.N. Barnard и первая клиническая пересадка сердца (3 декабря 1967 г.). В.П. Демихов и С.N. Barnard: точки соприкосновения / С.П. Глянцев, Б.М. Горелик, А.Вернер // Трансплантология. – 2020. – 12 (4). – С. 332–352.
11. Головкин, А.С. Новые аспекты влияния факторов иммунитета и микробиома на реакции отторжения трансплантированного сердца / А.С. Головкин, И.В. Кудрявцев, П.А. Федотов, [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2022. – 27 (8). – С. 135–141.
12. Готье, С.В. Трансплантация сердца как радикальный метод восстановления качества жизни у пациентов с терминальной стадией сердечной недостаточности / С.В. Готье, В.М. Захаревич, Т.А. Халилулин, [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т.21, №2. – С. 7–15.
13. Жердев, А.В. Пределы обнаружения иммуноаналитических систем: лимитирующие факторы и способы снижения / А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев // Журнал аналитической химии. – 2022. – Т. 77, № 4. – С. 298–311.
14. Заболотских, И.Б. Периоперационное ведение больных с хронической сердечной недостаточностью / И.Б. Заболотских, А.Е. Баутин, М.Н.

- Замятин, [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 2021. - №3. – С. 6–27.
- 15.** Иванюшкин, А.Я. Первая клиническая пересадка сердца в истории отечественной и зарубежной медицины / А.Я. Иванюшкин, Б.Г. Юдин, О.В. Попова, [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. 19. - № 3. – С. 104–115.
- 16.** Илларионова, Е.А. Основы метода масс-спектрометрии. Практическое применение метода: учебное пособие / Е.А. Илларионова, И.П. Сыроватской; ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, Кафедра фармацевтической и токсикологической химии. – Иркутск: ИГМУ, 2021. – 49 с.
- 17.** Каледа, В.И. Кристиан Барнард и его путь к пересадке сердца / В.И. Каледа // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2017. - № 21. – С. 92–100.
- 18.** Каратеев, Д.Е. Глюкокортикостероидный остеопороз: современные подходы к терапии / Д.Е. Каратеев, Е.Л. Лучихина // Эффективная фармакотерапия. Ревматология, травматология и ортопедия. – 2018. – № 3–4. – С. 16–25.
- 19.** Кван, В.С. Антителоопосредованное отторжение трансплантата сердца / В.С. Кван, Н.Н. Колоскова, Ю.А. Качанова, [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – Т. 23, № 4. – С. 47–61.
- 20.** Клинические рекомендации «Трансплантация сердца, наличие трансплантированного сердца, отмирание и отторжение трансплантата сердца» - Текст: электронный / Общероссийская общественная организация трансплантологов «Российское трансплантологическое общество» // Рубрикатор клинических рекомендаций – URL: [https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/762\\_1](https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/762_1). – Дата публикации: 16.03.2023.
- 21.** Колоскова, Н.Н. Гендерные аспекты развития кризов антителоопосредованного отторжения и васкулопатии трансплантата у реципиентов пересаженного сердца: опыт одного центра / Н.Н. Колоскова,

- В.Н. Попцов, В.М. Захаревич, [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21, №1. – С. 17–22.
- 22.** Колоскова, Н.Н. Конверсия на эверолимус с целью сохранения функции почек при трансплантации сердца, персонализированный подход при выборе иммуносупрессивной терапии / Н.Н. Колоскова, Е.А. Никитина, В.М. Захаревич, [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов.- 2018. – Т. 20, № 3. – С. 70–74.
- 23.** Колоскова, Н.Н. Медикаментозная терапия у реципиентов трансплантированного сердца: дис. ... доктора медицинских наук: 14.01.24 / Колоскова Надежда Николаевна; [Место защиты: ФГБУ «НМИЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» МЗ РФ]. – Москва, 2020. – 212 с.
- 24.** Колоскова, Н.Н. Персонализированный подход к выбору иммуносупрессивной терапии при трансплантации сердца / Н.Н. Колоскова, В.Н. Попцов, А.О. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2018. – Т. 20, № 1. – С. 127–137.
- 25.** Конев, Ю.В. Фармакотерапия в гериатрической практике / Ю.В. Конев, Л.Б. Лазебник // Фарматека. – 2016. - № 10. – С. 26–34.
- 26.** Король, Л.А. Проблемы эффективной фармакотерапии пациентов пожилого и старческого возраста / Л.А. Король, С.Н. Егорова, Д.А. Кудлай, [и др.] // Терапевтический архив. - 2022. – 94 (7). – С. 914–919.
- 27.** Космачева, Е.Д. Ингибиторы кальциневрина и артериальная гипертензия у реципиентов внутренних органов / Е.Д. Космачева, С.М. Мартиросян, М.Х. Лепшокова, [и др.] // Системные гипертензии. – 2017. – Т. 14, № 3. – С. 84–86.
- 28.** Ларина, В.Н. Хроническая сердечная недостаточность и фибрилляция предсердий: обновления и перспективы / В.Н. Ларина, И.К. Скиба, А.С.



Скиба, [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2022. – 27 (7). – С. 183–190.

- 29.** Максимова, Н.Е. Основы иммуноанализа: учебное пособие / Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, В.В. Емельянов; под общ. ред. Н.Н. Мочульской; Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Уральский федеральный университет. – Екатеринбург: Изд-во Урал. Ун-та, 2021. – 148 с. – ISBN 978-5-7996-3295-3. – Текст: непосредственный.
- 30.** Минаев, А.В. Сердечная недостаточность у взрослых пациентов с врожденными пороками сердца: современные принципы диагностики и лечения / А.В. Минаев, Т.О. Астраханцева // Креативная кардиология. – 2019. – 13 (2). – С. 147–158.
- 31.** Мирошниченко, И.И. Определение сывороточных / плазменных концентраций психотропных препаратов в терапевтическом лекарственном мониторинге / И.И. Мирошниченко, Н.В. Баймеева, А.И. Платова // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2021. – 1. – С. 3–13.
- 32.** Национальные клинические рекомендации «Лекарственный мониторинг и взаимозаменяемость оригинальных и генерических иммунодепрессантов с узким терапевтическим индексом» - Текст: электронный / Общероссийская общественная организация трансплантологов «Российское трансплантологическое общество». – 2014. – Режим доступа: [012014.pdf \(transpl.ru\)](https://transpl.ru)
- 33.** Никитин, А.В. Механизмы нефротоксического действия иммунодепрессантов – ингибиторов кальциейрина / А.В. Никитин // Антибиотики и химиотерапия. – 2014. - № 59. – С. 1–2.
- 34.** Никулин, А.В. Механизмы развития и факторы риска возникновения злокачественных новообразований у реципиентов солидных органов / А.В.

- Никулин, И.В. Пашков, Я.С. Якунин // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2021 – Т. 23, № 3. – С. 192–197.
- 35.** Никулин, С.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография: учебно-методическое пособие / С.В. Никулин, И.Л. Стародубцева, И.А. Попов – М.: МФТИ, 2016. – 39с.
- 36.** Окунская, Е.А. Стандарт качества рутинных методик высокоэффективной жидкостной хроматографии / Е.А. Окунская, К.С. Сычев, В.В. Орловская // Аналитика. – 2020. – Т.10, №4. – С. 304–313.
- 37.** Омарова, Ф.А. Главный комплекс гистосовместимости: история открытия, эволюция, строение, значение при трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток / Ф.А. Омарова, М.Ю. Дроков, Е.Г. Хамаганова // Трансплантология. – 2023. – Т. 15, № 2. – С. 251–265.
- 38.** Переверзев, А.П. Нарушение функции почек как фактор риска развития нежелательных реакций лекарственных средств / А.П. Переверзев, О.Д. Остроумова // Pharmacology & Pharmacotherapy. – 2022. – 1. – 60. – С. 60–72.
- 39.** Платонов, И.А. Хроматографические методы анализа: учеб. пособие. – Текст: электронный / И.А. Платонов, Е.А. Новикова, В.И. Платонов; М-во науки и высш. Образования Рос. Федерации, Самар. Нац. Исслед. Ун-т им. С.П. Королева. – Самара: Изд-во Самар. Ун-та, 2021. – ISBN 978-5-7883-1600-0.
- 40.** Поляков, Д.С. Хроническая сердечная недостаточность в Российской Федерации: что изменилось за 20 лет наблюдения? Результаты исследования ЭПОХА-ХСН / Д.С. Поляков, И.В. Фомин, Ю.Н. Беленков, [и др.] // Кардиология. - 2021. – 61 (4). – С. 4–14.
- 41.** Просекова, Е.В. Иммунологические методы исследования в клинической лабораторной диагностике: учебное пособие / Е.В. Просекова, Н.Р. Забелина, В.А. Сабаныч. – Владивосток: Медицина ДВ, 2016. – 120 с. ISBN 978-98301-070-3.

42. Резник, Е.В. Алгоритм лечения больных с хронической сердечной недостаточностью с низкой фракцией выброса левого желудочка / Е.В. Резник, И.Г. Никитин // Архив внутренней медицины. – 2018. - №2. – С. 85–99.
43. Родина Т.А. Терапевтический лекарственный мониторинг в больнице им. И.В. Давыдовского: опыт использования метода ВЭЖХ-МС/МС в практическом здравоохранении / Т.А. Родина, Е.С. Мельников // Медицинский алфавит. – 2019. – Т. 4, № 3. – С. 47–52.
44. Родионов, Г.Г. Опыт определения концентрации противоопухолевых препаратов как способ обеспечения безопасности фармакотерапии / Г.Г. Родионов, И.И. Шантырь, И.Э. Ушал, [и др.] // Клиническая патофизиология и фармакология. – 2018. – 16/1. – С. 64–70.
45. Рудаков, О.Б. Российская хроматография – времена и люди / О.Б. Рудаков, В.Ф. Селеменов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2014. – Т. 14, вып. 3. – С. 384–396.
46. Ставенчук Т.В. Проблема отторжения сердечного трансплантата и пути оптимизации оценки результатов эндомикардиальной биопсии / Т.В. Ставенчук, Е.Д.Космачева, И.А. Шелестова, [и др.] // Клиническая практика. - 2017–№ 3. – С. 28–33.
47. Ставенчук, Т.В. Анализ выживаемости и факторов риска у реципиентов с болезнью коронарных артерий сердечного трансплантата / Т.В. Ставенчук, Е.Д. Космачева, И.А. Шелестова, [и др.] // Южно-Российский журнал терапевтической практики. – 2021. – 2 (2). – С. 34–43.
48. Сычёв, Д.А. Изучение активности изоферментов цитохрома Р450 для прогнозирования межлекарственных взаимодействий средств в условиях полипрагмазии / Д.А. Сычёв, В.А., В.А. Отделенов, Н.П. Денисенко, [и др.] // Фармакогенетика и фармакогеномика. – 2016. - №2. – С. 4–11.

49. Тараканова, Ю.Н. Твердофазный иммуноферментный анализ: история, теория и практическое использование / Ю.Н. Тараканова, А.Д. Дмитриев, Д.А. Дмитриев, [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2019. - № 3. – С. 117–125.
50. Толкачев, Б.Е. Терапевтический лекарственный мониторинг с использованием метода «высушенной капли»: проблемы и перспективы / Б.Е. Толкачев, А.В. Стрыгин, И.С. Аникеев // Лекарственный вестник. – 2021. – Т. 15, № 3. – С. 13–20.
51. Тхатль, Л.К. Гуморальное отторжение трансплантированного сердца / Л.К. Тхатль, Е.Д. Космачева, О.Г. Компаниец // Трудный пациент. – 2017. – Т. 15., № 6–7. – С. 14-18.
52. Ульянкина, И.В. Первый Российский опыт ранней конверсии на эверолимус при трансплантации почек от доноров с расширенными критериями. Обобщение 5-летних результатов / И.В. Ульянкина, А.Е. Скворцов, А.Н. Ананьев, [и др.] // Нефрология. – 2017. – Т. 21, № 6. – С. 39–47.
53. Федотов, П.А. Факторы риска смерти больных, находящихся в листе ожидания трансплантации сердца / П.А. Федотов, М.А. Симоненко, Ю.В. Сазонова, [и др.] // Южно-Российский журнал терапевтической практики. – 2022. – 3 (2). – С. 41–54.
54. Хубутя, М.Ш. Иммунологическая толерантность при трансплантации органов / М.Ш. Хубутя, В.А. Гуляев, В.Б. Хватов, [и др.] // Трансплантология. – 2017. – Т. 9, № 3. – С. 211–225.
55. Шаварова, Е.К. Хроническая сердечная недостаточность: рекомендации и реальная клиническая практика / Е.К. Шаварова, Л.А. Бабаева, С.С. Падарьян, [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2016. – 12 (6). – С. 631–637.

56. Шляхто, Е.В. Основные направления снижения сердечно-сосудистой смертности: что можно уже сегодня? / Е.В. Шляхто, Е.И. Баранова // Российский кардиологический журнал. – 2020. – 25 (7). – С. 10–18.
57. Яншин, Я.И. Вклад российских специалистов в развитие высокоэффективной жидкостной хроматографии / Я.И. Яншин, А.Я. Яншин // Журнал аналитической химии. – 2020. – Т. 75, № 10. – С. 885–897.
58. Ali, A.H. High-performance liquid chromatography (HPLC): a review / A.H. Ali // Annals of advances in chemistry. – 2022. – 6. – P. 010-020.
59. Ansari, J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs commonly used in pregnancy and parturition / J. Ansari, B. Carvalho, S.L. Shafer, [et al.]. Anesthesia-analgesia. – 2016. – Vol. 122., № 3. – P. 786-804.
60. Arena, C. Everolimus therapy and side-effects: a systematic review and meta-analysis / C. Arena, Bizzoca M.E., Caponio V.C.A., [et al.] // International Journal of oncology. - 2021 – 59. – 54.
61. Arena, C. Stomatitis and everolimus: a review of current literature on 8,201 patients / C. Arena, G. Troiano, K. Zhurakivska [et al.] // OncoTargets and therapy. – 2019. – 12. – 9669.
62. Bhaioighill, M.N. Mechanistic target of rapamycin inhibitors: successes and challenges as cancer therapeutics / M.N. Bhaioighill, E.A. Dunlop // Cancer drug resistance. – 2019. – 2 (4). – P. 1069-1085.
63. Blandino-Rosano, M. Loss of mTORC<sub>1</sub> signalling impairs B-cell homeostasis and insulin processing / M. Blandino-Rosano, R. Barbaresso, M. Jimenez-Palomares, [et al.] // Nature communications. – 2017. – 8. – Article number: 16014.
64. Brozmanova, H. Laboratory methods in therapeutic drug monitoring / H. Brozmanova // Klin Farmakol Farm. – 2020. – 34 (2). – P. 56-62.

65. Brunet, M. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus – personalized therapy: second consensus report / M. Brunet, Van Gelder T., A. Asberg, et al. // Therapeutic drug monitoring – 2019. – 41 (3). – P. 261-307.
66. Buclin, T. The step to therapeutic drug monitoring: a structured approach illustrated with imatinib / T. Buclin, Y. Thoma, N. Widmer, [et al.] // Frontiers in pharmacology. – 2020. – Vol. 11. – Article 177.
67. Chawla, G. A review HPLC technique covering its pharmaceutical, environmental, forensic clinical and other applications / G. Chawla, K.K. Chaudhary // International journal of pharmaceutical chemistry and analysis. – 2019. – Vol. 6, I. 2. – P. 27-39.
68. Choi, H. Everolimus immunosuppression in de novo heart transplant recipients: clinical and intravascular ultrasound study / H. Choi, J. Hong, M. Kim, [et al.]. – 2019. – V. 38, I. 4. – S. 280.
69. Chojnacka-Purpurowicz, J. Cyclosporin-induced gingival overgrowth – review / J. Chojnacka-Purpurowicz, E. Wygonowska, W. Placek, et al. // Dermatologic therapy. – 2022. – V. 35, I. 12. – e15912.
70. Ciolczyk-Wierzbicka, D. mTOR inhibitor Everolimus-induced apoptosis in melanoma cells / D. Ciolczyk-Wierzbicka, M. Zarzycka, D. Gil, [et al.] // J. Cell Commun. Signal. – 2019. – 13. – P. 357-368.
71. Clarke, W. Clinical challenges in therapeutic drug monitoring: special population, physiological conditions, and pharmacogenomics / W. Clarke, A. Dasgupta. – Elsevier Inc., 2016. – 360 p.
72. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples. 3<sup>rd</sup> ed. CLSI guideline EP09c (ISBN 978-1-68440-006-5 [Print]; ISBN 978-1-38440-007-2 [Electronic]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2018.

73. Cooper, J.E. Everolimus in kidney transplantation / J.E. Cooper, U. Christians, A.C. Wiseman // *Transplant research and risk management*. – 2011. – 3. – P. 97-112.
74. Fort-Casamartina, E. First reported double drug-drug interaction in a cancer renal patient under everolimus treatment: therapeutic drug monitoring and review of literature / E. Fort-Casamartina, C. Munoz-Sanchez, R.F. Rigo-Bonin, [et al.] // *European Journal of medical research*. – 2023. – 28:202.
75. Garzon, V. Optical biosensor for therapeutic drug monitoring / V. Garzon, D.G. Pinacho, R.-H. Bustos, [et al.] // *Biosensors*. – 2019. – 9. – 132.
76. Goldraich, L.A. A comprehensive and contemporary review on immunosuppression therapy for heart transplantation / L.A. Goldraich, Tobar Leitao S.A., F.L. Scolari, [et al.] // *Current pharmaceutical*. – 2020. – V. 26, I. 28. – P. 3351-3384.
77. Gong, C. Efficacy and safety of everolimus in Chinese metastatic HR positive, HER2 negative breast cancer patients: a real-world retrospective study / C. Gong, Y. Zhao, B. Wang, [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 35. – P. 59810-59822.
78. Gonzalez-Vilchez, F. Efficacy and safety of de novo and early use of extended-release tacrolimus in heart transplantation / F. Gonzalez-Vilchez, J.L. Lambert, D. Rangel // *Rev Esp Cardiol*. – 2018. – 71 (1). – P. 18-25.
79. Grande, E. Рекомендации по лечению пациентов с прогрессирующим или метастатическим почечно-клеточным раком комбинацией ленватиниба и эверолимуса / E. Grande, H. Glen, J. Aller, [et al.] // *Онкоурология*. – 2020. – Vol. 16, № 4. – С. 61–81.
80. Gustafsson, F. Everolimus initiation with early calcineurin inhibitor withdrawal in de novo heart transplant recipients: long-term follow-up from the randomized SCHEDULE study / F. Gustafsson, A.K. Andreassen, B. Andersson, [et al.] // *Transplantation*. – 2020. – Vol. 104, №1. – P. 154-164.

- 81.** Heaney, L. Mass spectrometry in medicine: a technology for the future? / L. Heaney, D.J.L. Jone, T. Suzuki // *Future science OA*. – 2017. – 3 (3). <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0053>
- 82.** Hirt, S.W. Everolimus in heart transplantation: an update / S.W. Hirt, C. Bara, M.J. Barten, et al. // *Journal of transplantation*. – 2013. – V. 2013. - Article ID 683964. -12 pages.
- 83.** Hoffer, E. Comparisson of everolimus QMS immunoassay on Architect ci4100 and liquid chromatography/mass spectrometry: lack of agreement in organ – transplanted patients / E. Hoffer, D. Kurnik, E. Efrati, [et al.] // *Therapeutic drug monitoring*. – 2015. – 37 (2). – P. 214-219.
- 84.** Holdaas, H. Everolimus and malignancy after solid organ transplantation: a clinical update / H. Holdaas, P.D. Simone, A. Zuckermann // *Journal of transplantation*. - 2016. – Article ID 4369574. – 11 pages.
- 85.** Huiras, P. Everolimus: a review of its pharmacologic properties and use in solid organ transplantation / P. Huiras, S. Gabardi // *Reviews in health care*. – 2011. – 2 (4). – P. 229-241.
- 86.** Huo, Z. Cancer risks in solid organ transplant recipients: results from a comprehensive analysis of 72 cohort studies / Z. Huo, C. Li, X. Xu [et al.] // *Oncoimmunology*. – 2020. – 29 (9). – 1848068.
- 87.** Iannuzzo, G. Dyslipidemia in transplant patients: which therapy? / G. Iannuzzo, G. Cuomo, A. Di Lorenzo, [et al.] // *Journal of clinical medicine*. – 2022. – 11 (14). – 4080.
- 88.** Jain, M. Narrow therapeutic index drugs and role of therapeutic drug monitoring / M. Jain, A. Prakash, B. Medhi // *Drug bulletin*. – 2021. – Vol. 46, I. 1.
- 89.** Jakubowska, J. New insights into red blood cell microcytosis upon mTOR inhibitor administration / J. Jakubowska, B. Pawlik, K. Wyka, [et al.] // *International Journal of molecular sciences*. – 2021. – 22. – 6802.



- 90.** Jones, C. Therapeutic drug monitoring strategies and guidelines / C. Jones // *J Pharm Chem Chem Sci.* – 2022. – 6 (6).
- 91.** Jovanovic, M. Pediatric pharmacokinetic considerations and implications for drug dosing / M. Jovanovic, K. Vucicevic // *Arhiv farmacije.* – 2022. – 73 (3). – P. 340-352.
- 92.** Kadry, Z. Renal protective effect of everolimus in liver transplantation: a prospectiverandomized open-label trial / Z. Kadry, J.G. Stine, T. Dohi, [et al.] // *Transplantation direct.* – 2021. – 00: e709. – P. 1-12.
- 93.** Kaplan, B. Strategies for the management of adverse events associated with mTOR inhibitors / B. Kaplan, Y. Qazi, J.R. Wellen // *Transplantation reviews.* – 2014. – Vol. 28, I. 3. – P. 126-133.
- 94.** Khachane, M.A. Pharmaceutical analysis and validation: a review / M.A. Khachane, D.D. Masne, K.P. Jatte, [et al.] // *International journal of pharmacy and pharmaceutical research.* – 2021. – Vol. 21, I. 3. – P. 856-882.
- 95.** Kim, I.G. Analysis of early use of everolimus with low-dose calcineurin inhibitors in kidney transplant recipients / I.G. Kim, N.A. Tomilina, I.V. Ostrovskaya, [et al.] // *Russian Journal of transplantology and artificial organs.* – 2019. – Vol. 21, № 3. – P. 35-46.
- 96.** Kirchner, G.I. Clinical pharmacokinetics of everolimus / G.I. Kirchner, I. Meier-Wiedenbach, M.P. Manns // *Clinical pharmacokinetics.* – 2004. – 43 (2). – P. 83-95.
- 97.** Kovarik, J.M. Longitudinal assessment of everolimus in de novo renal transplant recipients over the first post-transplant year: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and influence on cyclosporine / J.M. Kovarik, B.D. Kahan, B. Kaplan // *Clinical pharmacology and therapeutic.* – 2001. – Vol. 69, №1. – P.48-56.

- 98.** Kurdi, A. mTOR inhibition and cardiovascular diseases: dyslipidemia and atherosclerosis / A. Kurdi, W. Martinet, G.R.Y. De Meyer, [et al.] // *Transplantation*. – 2018. – Vol. 102, № 2S-1. – S. 44-46.
- 99.** Lau, D.K. Phase II study of everolimus (RAD001) monotherapy as first-line treatment in advanced biliary tract cancer with biomarker exploration: the RADiChol study / D.K. Lau, R.Y. Tay, Y.H. Yeung, [et al.] // *British Journal of cancer*. – 2018. – 118 (7). – P. 966-971.
- 100.** Li, C. Towards higher sensitivity of mass spectrometry: a perspective from the mass analyzers / C. Li, C. Shiyang, S. Tan, [et al.] // *Frontiers in chemistry*. – 2021. – Vol. 9. – Article 813359.
- 101.** Liu, C.-T. The efficacy and safety of everolimus for the treatment of progressive gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: a multi-institution observational study in Taiwan / C.-T. Liu, M.-H. Chen, J.-S. Chen, [et al.] // *Journal of clinical oncology*. – 2016. – 12 (4). – P. 396-402.
- 102.** Liu, Y. Revolutionizing precision medicine: exploring wearable sensors for therapeutic drug monitoring and personalized therapy / Y. Liu, J. Li, S. Xiao, [et al.] // *Biosensors*. – 2023. – 13. – 726.
- 103.** Luxminarayan, L. A review on chromatography techniques / L. Luxminarayan, S. Neha, V. Amit, [et al.] // *Asian journal of pharmaceutical research and development*. – 2017. – Vol. 5 (2). – P. 1-8.
- 104.** Mir, S.A. Exploring the mTOR signalling pathway and its inhibitory scope in cancer / S.A. Mir, A. Dar, S.A. Alshehry, [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2023. – 16. – 1004.
- 105.** Mogollon, N.G.S. New advances in toxicological forensic analysis using mass spectrometry techniques / N.G.S. Mogollon, C.D. Quiroz-Moreno, P.S. Prata, [et al.] // *Journal of analytical methods in chemistry*. – 2018. – Vol. 2018. – Article 4142527.

- 106.** Monaco, A.P. Everolimus and long-term outcomes in renal transplantation: seeking an optimal strategy for immunosuppression / A.P. Monaco, P.J. Morris // *Transplantation*. – 2011. – T. 92, № 3S. – S. 1-26.
- 107.** Murviducci, L. Everolimus is a new anti-cancer molecule: metabolic side effect as lipid disorders and hyperglycemia / L. Murviducci, F. Rota, L. Rizza, [et al.] // *Diabetes research and clinical practice*. – 2018. – 143. – P. 428-431.
- 108.** Oellerich, M. Therapeutic drug monitoring – key to personalized pharmacotherapy / M. Oellerich, P. Kanzow, P.D. Walson // *Clinical biochemistry*. – 2017. – Vol. 50. – I. 7-8. – P. 375-379.
- 109.** Parrella, A. Hematological drugs affecting lipid metabolism and vascular health / A. Parrella, A. Iannuzzi, M. Annunziata, [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. – 10. – 1935.
- 110.** Pascual, J. Recommendations for the use of everolimus in de novo kidney transplantation: false beliefs, myths and realities / J. Pascual, F. Diekmann, C. Fernandez-Rivera, [et al.] // *Nefrologia*. – 2017. – 37 (3). – P. 253-266.
- 111.** Pippenger, C.E. An overview of therapeutic drug monitoring principles / C.E. Pippenger, R.P. Lesser // *Cleveland Clinic Quarterly*. – 1984. – Vol. 51, № 2. – P. 241-254.
- 112.** Sadapha, P. Review article on high-performance liquid chromatography (HPLC) method development and validation / P. Sadapha, K. Dhamak // *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* – 2022. – 74 (2). – Article № 3. – P. 23-29.
- 113.** Sadowski, K. Management of side effects of mTOR inhibitors in tuberous sclerosis patients / K. Sadowski, K. Kotulska, S. Jozwiak // *Pharmacological reports*. – 2016 – Vol. 68, I. 3. – P. 536-542.
- 114.** Saleem, M.A. Role of clinician in therapeutic drug monitoring practice / M.A. Saleem, R. Basharat, N.A. Rana, [et al.] // *Clin. Pract.* – 2020. – 17 (1). – P. 1429-1435.

- 115.** Sanchez-Fructuoso, A.I. Everolimus: an update on the mechanism of action, pharmacokinetics and recent clinical trials / A.I. Sanchez-Fructuoso // Expert opinion on drug metabolism and toxicology. – 2008. – 4 (6). – P. 807-819.
- 116.** Schumacher, L. Tacrolimus inpatient variability in solid organ: a multiorgan perspective / L. Schumacher, D.L. Abbie, J.M. Park // Pharmacotherapy. – 2021. – V. 41, I. 41. – P. 103-118.
- 117.** Shawkatova, I. Laboratory methods in immunology / I. Shawkatova, V. Durmanova, J. Javor, 2019. – p. 121 – ISBN: 978-80-2234076-2.
- 118.** Shipkova, M. Therapeutic Drug Monitoring of Everolimus: A Consensus Report / M. Shipkova, D. A. Hesselink, D. W. Holt, [et al.] // Ther Drug Monit. – 2016. – Vol. 38. – Iss. 2. – P. 143–169. – C. 163–169.
- 119.** Simonenko, M. Outcomes of everolimus after heart transplantation / M. Simonenko, P. Fedotov, Y. Sazonova, [et al.] // Transplantation. – 2020. – 104 (S3). – P. S627.
- 120.** Sivendran, S. Metabolic complications with the use of mTOR inhibitors for cancer therapy / S. Sivendran, N. Agarwal, B. Gartrell, [et al.] // Cancer treatment reviews. – 2014. – 40 (1). – P. 190-196.
- 121.** Tammisetti, V. Immunosuppressive therapy in solid organ transplantation / V. Tammisetti, R.P. Srinivasa, N. Dasyam, [et al.] // Radiologic clinics of North America. – 2023 – 61 (2). – P. 913-932.
- 122.** Tan, L. Everolimus delayed and suppressed cytomegalovirus DNA synthesis, spread of the infection, and alleviated cytomegalovirus infection / L. Tan, N. Sato, A. Shiraki, [et al.] // Antiviral research. – 2019. – V. 162. – P. 30-38.
- 123.** Tanimura, J. The clinical course and potential underlying mechanisms of everolimus-induced hyperglycemia / J. Tanimura, H. Nakagawa, T. Tanaka, [et al.] // Endocrine Journal. – 2019. – 66 (7). – P. 615-620.

- 124.** Tedesco-Silva, H. An overview of the efficacy and safety of everolimus in adult solid organ transplant recipients / H. Tedesco-Silva, F. Saliba, M.J. Barten, [et al.] // *Transplantation reviews*. – 2022. – Vol. 36, I. 1. – 100655.
- 125.** Thongprayoon, C. Impact of high intra- and inter-individual variability in tacrolimus pharmacokinetics and fast tacrolimus metabolism on outcomes of solid organ transplant recipients / C. Thongprayoon, P. Hansrivijit, K. Kovvuru, et al. // *Journal of clinical medicine*. – 2020. – 9 (7). – 2193.
- 126.** Tona, F. Everolimus prevents coronary microvasculopathy in heart transplant recipients with normal coronary angiograms: an anatomy-functional study / F. Tona, M. Fedrigo, G. Famoso, [et al.] // *Transplantation proceedings*. – 2014. – 46 (7). – P. 2339-2344.
- 127.** Tuzimski, T. Review of chromatographic methods coupled with modern detection techniques applied in the therapeutic drugs monitoring / T. Tuzimski, A. Petruczynik // *Molecules*. – 2020. – 25 (17).
- 128.** Udomkarnjananun, S. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs in hepatology and gastroenteriology / S. Udomkarnjananun, M.I. Francke, B.C.M. De Winter, [et al.] // *Best practice & research clinical gastroenterology*. – 2021. – 54-55. – 101756.
- 129.** Urbanski, B. Hematological toxicity of mTOR inhibitors is mild and dose-dependent in patients with tuberous sclerosis and subependymal giant cell astrocytoma / B. Urbanski, B. Pawlik, W. Młynarski, [et al.] // *Acta haematologica polonica*. – 2023. – Vol. 54, № 4. – P. 227-234.
- 130.** U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine. Guidance for Industry, bioanalytical method validation. // [www.fda.gov](http://www.fda.gov) – 2018.
- 131.** Van Gelder, T. Optimizing everolimus exposure when combined with calcineurin inhibitors in solid organ transplantation / T. van Gelder, L. Fischer, F.

Shihab // Transplantation reviews. – 2017. – V. 31, I. 3. – P. 151-157.  
<https://doi.org/10.1016/j.trre.2017.02.007>

- 132.** Verdu, L.S. Clinical impact of variability in blood concentrations of calcineurin inhibitors in heart transplant: a double-sword / L.S. Verdu, E. Garcia-Romero, C. Diez-Lopez // Revista Espanola de cardiologia. – 2022. – 75 (2). – P. 112-114.
- 133.** Verges, B. mTOR and cardiovascular diseases: diabetes mellitus / B. Verges // Transplantation. – 2018. – Vol. 102., № 2S-1. – P. S47-S49.
- 134.** Verstraete, A.G. Multicenter evaluation of a new electrochemiluminescence immunoassay for everolimus concentrations in whole blood / A.G. Verstraete, R. Rigo-Bonnin, P. Wallemacq, [et al.] // Therapeutic drug monitoring. – 2018. – Vol. 40, № 1. – P. 59-68.
- 135.** Ward, G. The investigation of interferences in immunoassay / G. Ward, A. Simpson, L. Boscato, [et al.] // Clinical biochemistry. – 2017. – Vol. 50, I. 18. – P. 1306-1311.
- 136.** Xia, T. Risk factors for calcineurin inhibitor nephrotocity after renal transplantation: a systematic review and meta-analysis / T. Xia, S. Zhu, Y. Wen, et al. // Drug design, development and therapy. – 2018. - № 12. – P. 417-428. DOI: 10.2147/DDDT.S149340
- 137.** Yusen, R.D. The registry of the international society for heart and lung transplantation: thirty-third adult lung and heart-lungtransplant report – 2016; Focus theme: primary diagnostic indications for transplant / R.D. Yusen, L.B. Edwards, A.I. Dipchand, [et al.] // The Journal of heart and lung transplantation – 2016. – Vol. 35, № 10. – P. 1172-1184.
- 138.** Zeng, L. The guideline for therapeutic drug monitoring guidelines development / L. Zeng, Q. Yi, L. Huang, [et al.] // Journal of evidence-based medicine. – 2022. – 15. – P. 272-283.

- 139.** Zou, Z. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges / Z. Zou, T. Tao, H. Li [et al.] // Cell and bioscience. – 2020. – 10:31. – P. 11. DOI: [10.1186/s13578-020-00396-1](https://doi.org/10.1186/s13578-020-00396-1)

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Примеры масс-хроматограмм, полученных при выполнении количественного определения эверолимуса в образцах пациентов методом ВЭЖХ-МС/МС, реализуемом с помощью модифицированной методики.

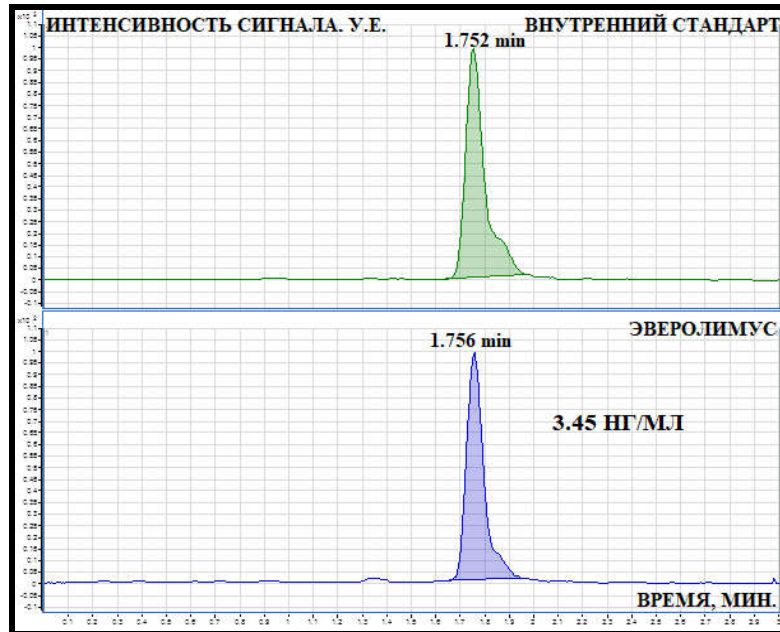


Рисунок 1. Масс-хроматограмма, полученная при выполнении количественного определения эверолимуса в образце пациента №1 методом ВЭЖХ-МС/МС, реализуемом с помощью модифицированной методики

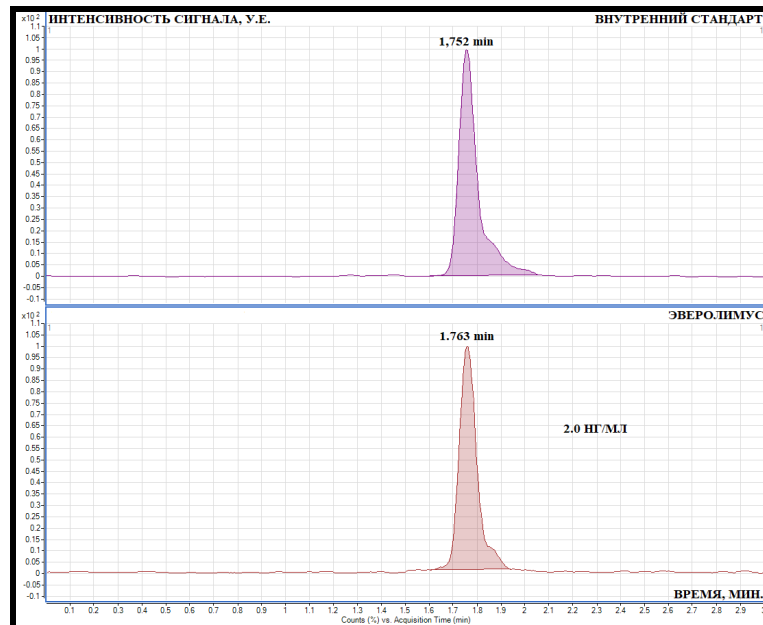
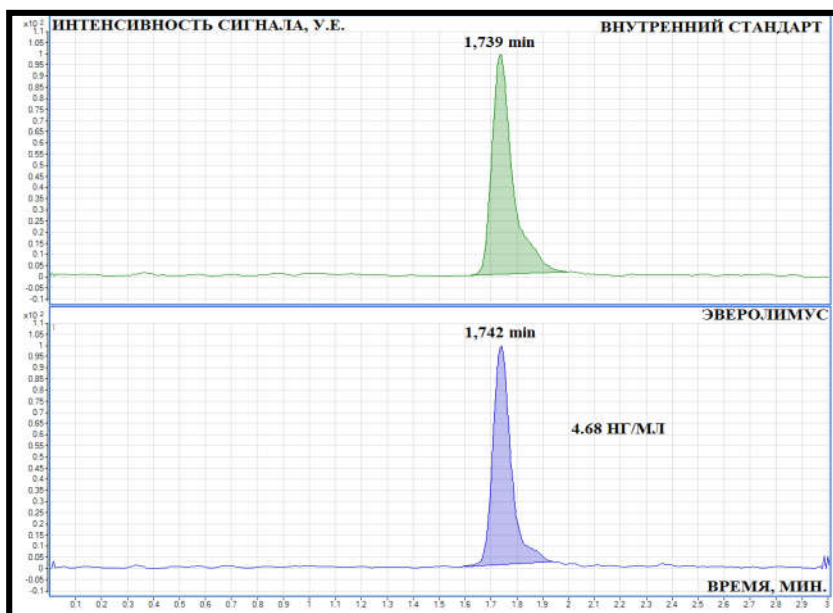
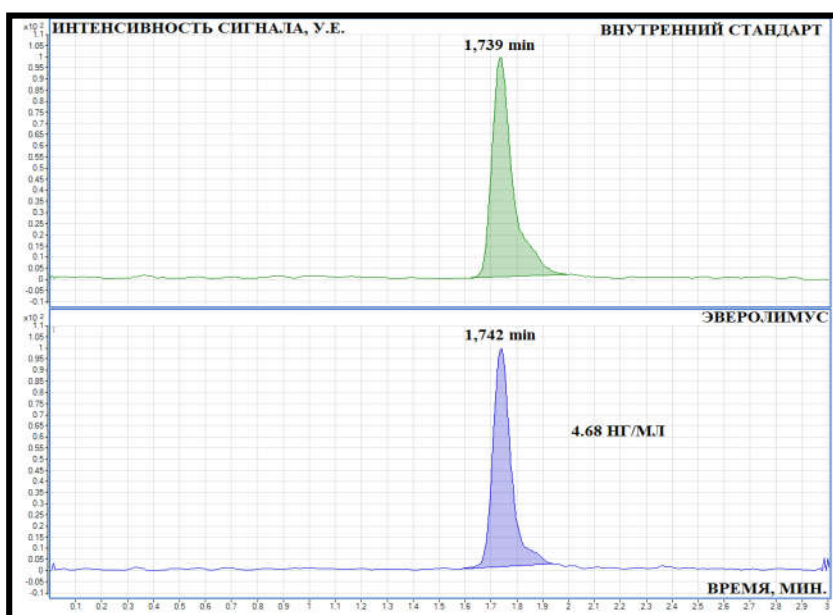


Рисунок 2. Масс-хроматограмма, полученная при выполнении количественного определения эверолимуса в образце пациента №2 методом ВЭЖХ-МС/МС, реализуемом с помощью модифицированной методики

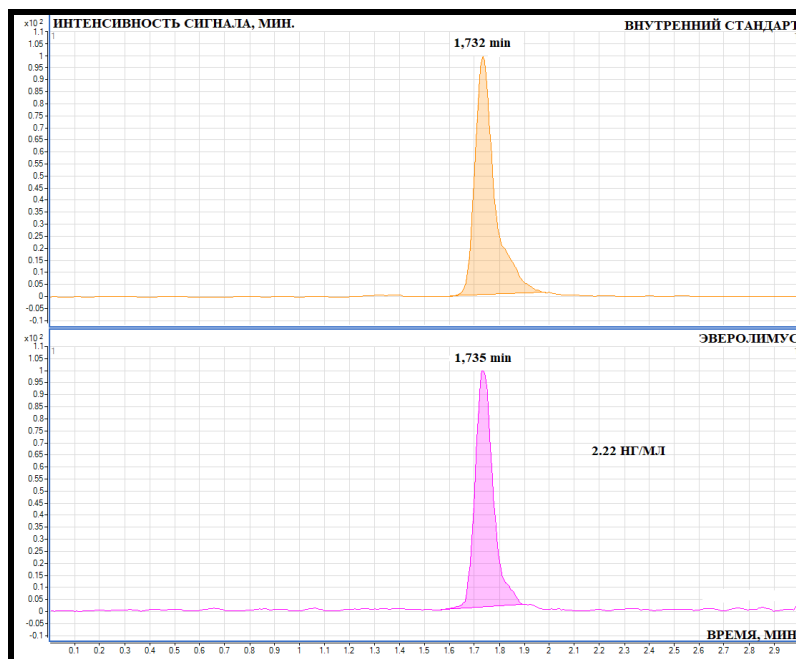




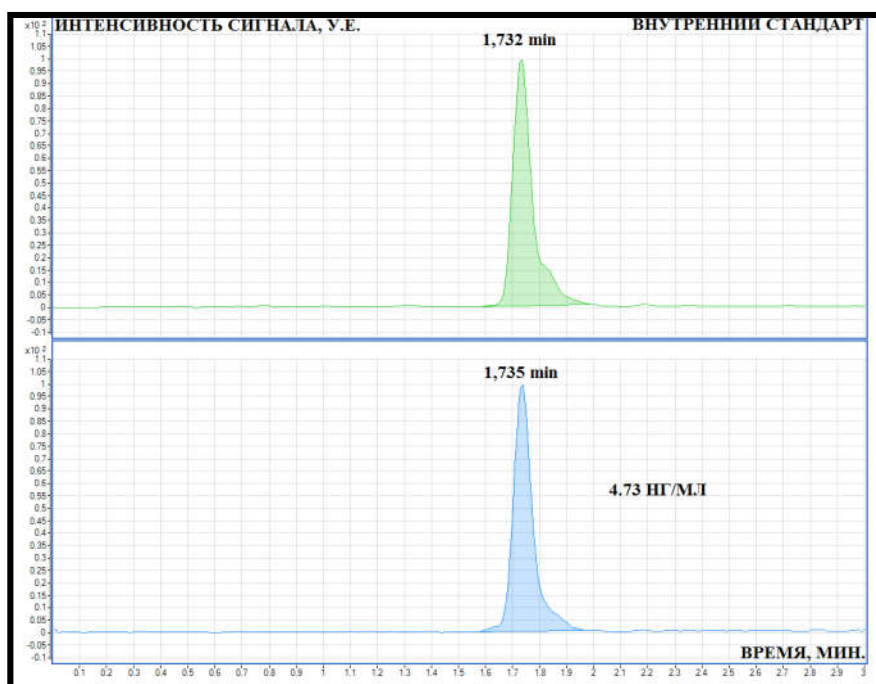
**Рисунок 3. Масс-хроматограмма, полученная при выполнении количественного определения эверолимуса в образце пациента №3 методом ВЭЖХ-МС/МС, реализуемом с помощью модифицированной методики**



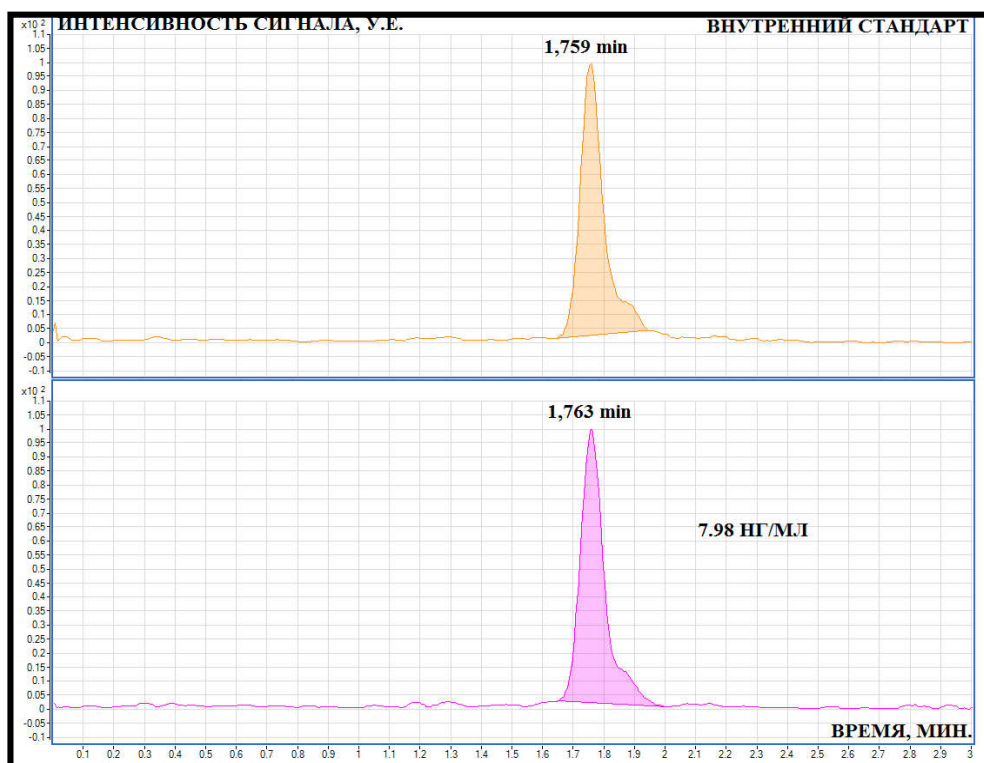
**Рисунок 4. Масс-хроматограмма, полученная при выполнении количественного определения эверолимуса в образце пациента №4 методом ВЭЖХ-МС/МС, реализуемом с помощью модифицированной методики**



**Рисунок 5.** Масс-хроматограмма, полученная при выполнении количественного определения эверолимуса в образце пациента №5 методом ВЭЖХ-МС/МС, реализуемом с помощью модифицированной методики



**Рисунок 6.** Масс-хроматограмма, полученная при выполнении количественного определения эверолимуса в образце пациента №6 методом ВЭЖХ-МС/МС, реализуемом с помощью модифицированной методики



**Рисунок 6. Масс-хроматограмма, полученная при выполнении количественного определения эверолимуса в образце пациента №7 методом ВЭЖХ-МС/МС, реализуемом с помощью модифицированной методики.**