

ФЕДОРЕНКО ВОЛОДИМИР

Київський національний університет технологій та дизайну

Акціонерне товариство «Фармак»

<https://orcid.org/0009-0003-5113-6848>e-mail: fedorenko.vv@knu.edu.ua**БЕГДАЙ АНАСТАСІЯ**

Київський національний університет технологій та дизайну

<https://orcid.org/0009-0001-9868-066X>e-mail: a.behdai@kyivpharma.eu

ВАЛІДАЦІЯ НЕФЕЛОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ КОАГУЛЯЦІЇ ПЛАЗМИ КРОВІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ МАТЕМАТИЧНОЇ МОДЕЛІ ДЛЯ ЇЇ АНАЛІЗУ

Підвищення біодоступності пероральних лікарських засобів є одним із важливих завдань фармацевтичної розробки, особливо для активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) з низькою розчинністю. Одним з ефективних методів підвищення розчинності є створення твердих дисперсних систем (ТДС), які покращують розчинність АФІ. Прикладом такого інгредієнта з низькою розчинністю у воді є ривароксабан – прямий пероральний антикоагулянт. Однак, щоб об'єктивно оцінити, як покращена розчинність впливає на фармакологічну активність, необхідні надійні та валідовані аналітичні методики, які коректно відображають ключовий фармакодинамічний ефект – зміну кінетики коагуляції плазми крові при дії АФІ. Тому, метою дослідження була валідація аналітичної *in vitro* методики дослідження кінетики коагуляції плазми крові з використанням лазерного нефелометра. Ключовим завданням було довести, що методика є надійною, точною та відтворюваною, що дозволить використовувати її для обґрунтованої оцінки впливу нових лікарських форм ривароксабану, зокрема ТДС, на його антикоагулянтну активність.

Методику було валідовано на лазерному нефелометрі NEPHELOstar. Процедура валідації включала перевірку ключових параметрів: специфічність, робастність, прецизійність та лінійність. Для обробки отриманих S-подібних кінетичних кривих та розрахунку аналітичних параметрів, зокрема максимальної швидкості коагуляції (v_{max}), було застосовано чотирихпараметричну математичну модель Вейбулла.

У результаті дослідження було підтверджено відповідність методики всім валідаційним критеріям. Доведено її специфічність, високу робастність до незначних змін умов аналізу (температури та часу вимірювання) та прецизійність. Встановлено чітку залежність між концентрацією ривароксабану (в діапазоні 5–15 мкМ) та максимальною швидкістю коагуляції з високим коефіцієнтом детермінації, що підтверджує її придатність для вивчення процесу згортання плазми крові.

Валідована нефелометрична *in vitro* методика є точним, відтворюваним та надійним інструментом для вивчення кінетики коагуляції плазми крові та оцінки впливу антикоагулянтів, зокрема ривароксабану. Методика може бути рекомендована для використання у фармацевтичній розробці для порівняльного аналізу та контролю якості інноваційних лікарських форм, спрямованих на підвищення розчинності та біодоступності АФІ.

Ключові слова: тверда дисперсна система, ривароксабан, коагуляція, нефелометр, активний фармацевтичний інгредієнт, модель Вейбулла

FEDORENKO VOLODYMYR

Kyiv National University of Technologies and Design

«Farmak» Joint Stock Company

BEHDAI ANASTASIIA

Kyiv National University of Technologies and Design

VALIDATION OF THE NEPHELOMETRIC METHOD FOR DETERMINING BLOOD PLASMA COAGULATION AND APPLICATION OF A MATHEMATICAL MODEL FOR ITS ANALYSIS

Increasing the bioavailability of oral drugs is a key task in pharmaceutical development, especially for active pharmaceutical ingredients (APIs) with low solubility. One effective method is to create solid dispersion systems (SDS) that improve the solubility of APIs. An example of such an ingredient is rivaroxaban, a direct oral anticoagulant. However, in order to objectively assess how improved solubility affects pharmacological activity, reliable and validated analytical methods are needed that are capable of quantitatively analysing the key pharmacodynamic effect – the change in blood plasma coagulation kinetics. Therefore, the aim of the study was to validate an *in vitro* analytical method for studying the kinetics of blood plasma coagulation using a laser nephelometer. The key task was to prove that the method is reliable, accurate and reproducible, which will allow it to be used for a reasonable assessment of the effect of new rivaroxaban dosage forms, in particular TDS, on its anticoagulant activity.

The method was validated on a NEPHELOstar laser nephelometer. The validation procedure included verification of key parameters: specificity, robustness, precision and linearity. To process the obtained S-shaped kinetic curves and calculate analytical parameters, in particular the maximum coagulation rate (v_{max}), a four-parameter mathematical Weibull model was used.

The study confirmed the compliance of the method with all validation criteria. Its specificity, high robustness to minor changes in analysis conditions (temperature and measurement time) and precision were proven. A clear relationship was established between the concentration of rivaroxaban (in the range of 5–15 μM) and the maximum rate of coagulation with a high coefficient of determination, confirming its suitability for studying the coagulation process.

The validated nephelometric *in vitro* method is an accurate, reproducible and reliable tool for studying the kinetics of blood plasma coagulation and assessing the effect of anticoagulants, in particular rivaroxaban. The method can be recommended for use in pharmaceutical development for comparative analysis and quality control of innovative dosage forms aimed at increasing the solubility and bioavailability of APIs.

Keywords: solid dispersion system, rivaroxaban, coagulation, nephelometer, active pharmaceutical ingredient, Weibull model

Стаття надійшла до редакції / Received 22.10.2025

Прийнята до друку / Accepted 15.11.2025

Постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями

Антикоагулянтна терапія є однією з найважливіших складових сучасної медицини, адже саме вона дозволяє знижувати ризики розвитку тромбозів і тромбоемболічних ускладнень, що залишаються однією з провідних причин смертності у світі. На теперішній час серед нових оральних антикоагулянтів особливе місце посідає ривароксабан – прямий селективний інгібітор фактора Ха, що зупиняє каскад реакцій згортання крові. Його застосування значно спростило підхід до тривалої антикоагулянтної терапії, за рахунок забезпечення швидкого і прогнозованого антикоагулянтного ефекту. Проте фармакокінетичні характеристики АФІ залежать від лікарської форми та кінцевої розчинності діючої речовини.

Так, в дослідженні [1] показано, що полімерні аморфні дисперсії здатні значно підвищувати розчинність ривароксабану та покращувати його біофармацевтичний профіль. Це відбувається за рахунок переведення АФІ у термодинамічно нестабільний, але більш біодоступний стан, що дозволяє досягти кращої абсорбції у шлунково-кишковому тракті. Це підтверджує, що саме технологічні підходи при фармацевтичній розробці можуть суттєво впливати на клінічну ефективність препарату, зокрема такі дані наводять роботи [2] та [3]. Тому, використання твердих дисперсних систем дозволяє значно підвищити розчинність та відповідно – біодоступність препарату.

Проте, для проведення ефективних досліджень з розробки таких систем необхідно мати валідовані методики кількісної та функціональної оцінки їхнього впливу на коагуляцію плазми крові. Саме тому проблема розробки та валідації надійних методик аналізу й контролю ефективності нових твердих дисперсних систем є актуальною та важливою.

Аналіз досліджень та публікацій

Вивчення літературних даних показує, що процеси розробки та валідації аналітичних методів для контролю нових оральних антикоагулянтів є надзвичайно важливими, оскільки стандартні коагуляційні тести часто демонструють високу варіабельність у присутності цих препаратів. Одним із напрямів таких досліджень є створення аналітичних систем, чутливих саме до засобів антикоагулянтної дії. У нещодавньому дослідженні [5] описано розробку та валідацію цілком нового коагулометра, здатного відтворювати визначати вплив ривароксабану, апіксабану та дабігатрану на згортання у цільній крові. Це відкриває перспективи застосування більш зручних для рутинної практики методів. Ще одним важливим внеском у цю сферу стало створення валідованого LC–MS/MS методу для одночасного кількісного визначення дабігатрану, ривароксабану та апіксабану в плазмі крові людини [6]. Така технологія забезпечує високоточне визначення концентрацій препарату та може служити еталонним методом при калібруванні функціональних коагуляційних тестів.

Підходи до кількісного контролю нових оральних антикоагулянтів розглядаються в роботі [7], де було продемонстровано, що для забезпечення коректності результатів кожен тест на зразках плазми пацієнтів, які їх отримують, має бути ретельно валідований. Автори наголошують, що у випадку ривароксабану необхідно враховувати як фармакокінетичні параметри, так і особливості взаємодії препарату з лабораторними реагентами. Подібні висновки підтверджують і клінічні роботи з використанням методів ротаційної тромбоеластометрії та систем аналізу загального тромбоутворення, що застосовуються для моніторингу антикоагулянтного ефекту в реальних умовах [8].

Застосування нефелометрії для оцінки стану системи згортання в останні роки набуває особливого значення. Вчені [9] довели, що високопродуктивна нефелометрія дозволяє швидко оцінювати рівень тромбофілії та ризик венозних тромбозів. Перевагами методу є його висока пропускна здатність, точність і можливість автоматизації. Проте застосування нефелометрії у контексті нових оральних антикоагулянтів потребує додаткової стандартизації. На міжнародних конференціях неодноразово підкреслювалося, що для коректного використання цього методу потрібна його адаптація до специфічних умов антикоагулянтної терапії [10, 11].

Нові клінічні дисертаційні роботи демонструють, що пацієнти з фібриляцією передсердь, які отримують терапію апіксабаном або ривароксабаном, потребують адаптованих методів контролю, і нефелометрія може відігравати в цьому ключову роль [12]. Водночас міжнародні конгреси лабораторної медицини вже кілька років поспіль підкреслюють важливість розробки методології саме для моніторингу ривароксабану та апіксабану на основі нефелометрії [13].

Таким чином, сучасна наукова база свідчить, що валідація аналітичних методик для нових пероральних антикоагулянтів, включно з LC–MS/MS, новітніми коагулометрами та нефелометричними системами, є критично необхідною для подальшої інтеграції нових фармацевтичних форм ривароксабану у практику. З одного боку, тверді дисперсні системи покращують фармакокінетичні властивості препарату і створюють передумови для підвищення його клінічної ефективності. З іншого боку, лише валідовані методи визначення їхнього впливу на згортання дозволять коректно оцінити реальний терапевтичний ефект. Нефелометрія постає як один із найперспективніших підходів завдяки швидкості, відтворюваності та можливості автоматизації, однак для її застосування потрібні широкомасштабні дослідження і стандартизація. Поєднання фармацевтичних інновацій із валідованими лабораторними інструментами відкриває нові горизонти для персоналізованої антикоагулянтної терапії.

Формулювання цілей статті

Метою роботи є валідація нефелометричної методики для оцінки впливу ривароксабану на кінетику коагуляції плазми крові як надійного інструменту для подальшого використання у розробці та контролі якості його інноваційних лікарських форм, зокрема твердих дисперсних систем.

Виклад основного матеріалу

Реактиви та обладнання. Для виконання експериментальної частини роботи застосовували такі реактиви: ривароксабан (Assia Chemical Industries Ltd, Ізраїль); диметилсульфоксид (Merck KGaA, Німеччина); кальцію хлорид (ПАТ «Галичфарм», Україна); контрольні зразки плазми Dia-CONT I-II для коагуляційних тестів (Діагон ЛТД, Угорщина); реагент для визначення АЧТЧ, рідкий Dia-PTT LIQUID (Діагон ЛТД, Угорщина); вода очищена.

У ході досліджень використовували таке обладнання та допоміжні матеріали: аналітичні ваги AS 60/220. R2 (Radwag, Польща); система водоочистки RO-4 (Werner, Німеччина); мікропробірки типу Eppendorf об'ємом 2 мл; лазерний нефелометр NEPHELOstar (BMG LABTECH GmbH, Німеччина); кварцові кювети з оптичною довжиною шляху 1 см (Agilent, США); термостат для кювет DB-10C (Biosan, Латвія); одноканальні напівавтоматичні дозатори об'ємами 50, 1000 мкл (Dragon-Lab, Китай); таймер; лабораторний посуд.

Підбір параметрів перевірки придатності системи. Перевірка придатності системи – це тести, що розробляються та проводяться для перевірки того, що вимірювальна система та аналітичні операції, які пов'язані з аналітичною процедурою, відповідають визначеній меті. Ці тести підвищують можливість виявлення неприйнятних результатів розробленої методики [4].

Одним із ключових аспектів придатності нефелометричної системи для аналізу коагуляції є її здатність функціонально реагувати на ініціювання процесу згортання крові. Для підтвердження адекватності її роботи було проведено функціональний тест, що включав аналіз двох типів зразків:

- негативний контроль: зразок без додавання ключового активатора – розчину хлориду кальцію (CaCl_2). Очікуваний результат – відсутність видимої реакції коагуляції та стабільний сигнал зчитувача.
- тестовий зразок: зразок, до якого було додано розчин CaCl_2 для запуску каскаду згортання. Очікуваний результат – утворення фібринового згустку, що має реєструватися системою як значне зростання сигналу зчитувача. Результати цього тестування представлені на рисунку 1.

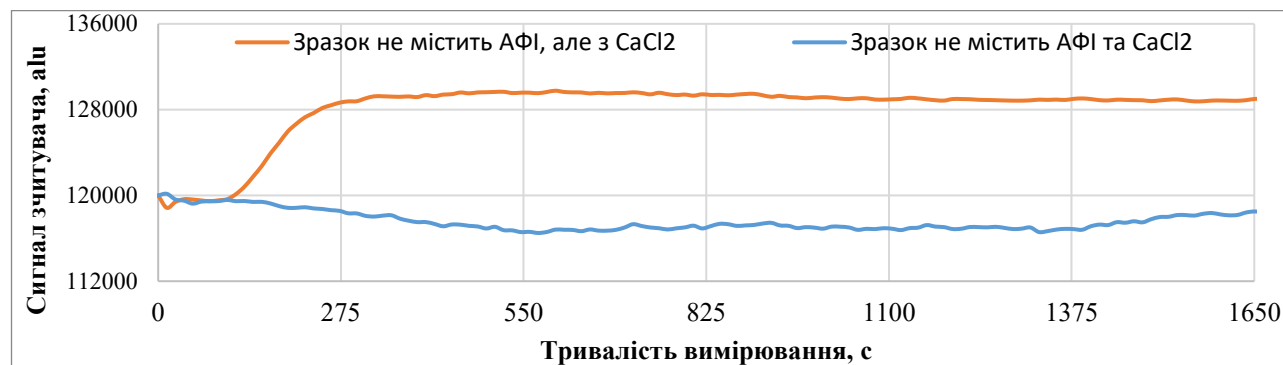


Рис. 1 Кінетичні криві коагуляції для тестування функціональної придатності методики

Аналіз отриманих кінетичних кривих дозволяє зробити однозначні висновки щодо функціональної придатності аналітичної системи. На графіку чітко видно, що для зразка без додавання хлориду кальцію (синя лінія) сигнал зчитувача залишається практично незмінним протягом усього періоду вимірювання. Це підтверджує, що система не реєструє неіснуючий процес коагуляції за відсутності необхідного реагенту. Навпаки, у зразку, до якого було додано CaCl_2 (помаранчева лінія), спостерігається характерна S-подібна крива. Вона демонструє різке зростання сигналу, що відповідає активній фазі утворення фібринового згустку, з подальшим виходом на плато.

Таким чином, той факт, що аналітична система належним чином реагує на ініціювання коагуляції та демонструє стабільну базову лінію за відсутності активатора, доводить її адекватність та функціональність. Тому, система є придатною для подальшого використання у валідаційних дослідженнях.

Підтвердження специфічності/селективності аналітичної методики. Специфічність аналітичної методики – це її здатність однозначно оцінювати аналізовану речовину (аналіт) в присутності інших компонентів, які можуть бути у зразку. До таких компонентів належать, зокрема, домішки, продукти розкладу та інші речовини, що є частиною досліджуваної матриці. Селективність, або вибірковість, методики є однією з важливих її характеристик, оскільки неселективна методика може давати хибні результати.

Для підтвердження того, що нефелометрична система реєструє саме процес коагуляції і не реагує на сторонні фактори, було проведено експеримент, що серед іншого, включав дослідження зразків із додаванням АФІ. Було підготовлено чотири зразки для порівняння. Результати дослідження представлено на рисунку 2.

Аналіз отриманих кінетичних кривих дозволяє підтвердити високу специфічність та селективність аналітичної системи. Так, криві, що відповідають зразкам без додавання CaCl_2 (синій та сірий графіки), підтверджують відсутність коагуляції, що відображається майже незмінним сигналом зчитувача, який демонструє стабільну базову лінію протягом усього вимірювання. Це переконливо доводить, що теоретичні очікування (відсутність спонтанної коагуляції та реакції на АФІ) повністю підтверджуються практичними даними на графіках. Такий результат є важливим доказом селективності системи, оскільки вона не має додаткової реакції на наявність АФІ у зразку.

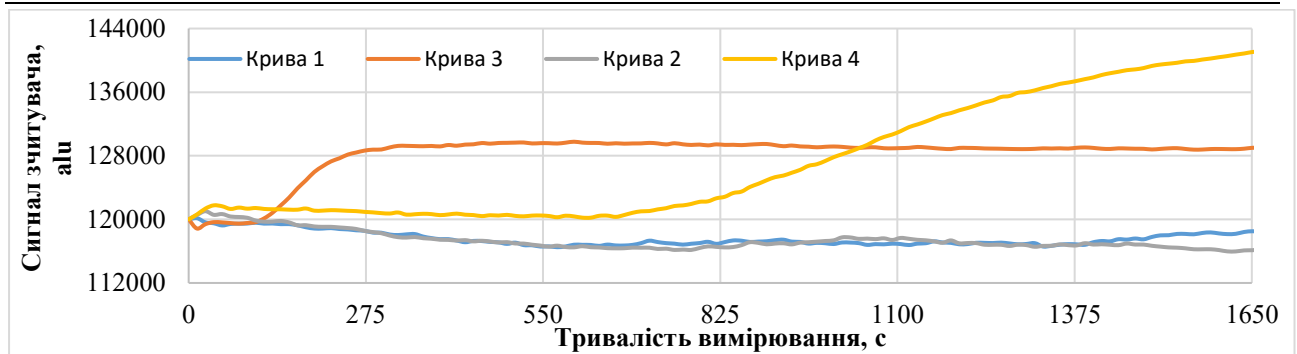


Рис. 2 Кінетичні криві коагуляції для тестування специфічності методики (зразок без АФІ та без CaCl_2 (негативний контроль, крива 1); зразок без АФІ, але з CaCl_2 (позитивний контроль, крива 2); зразок з АФІ, але без CaCl_2 (перевірка впливу самого АФІ, крива 3); зразок з АФІ та з CaCl_2 (оцінка специфічності в присутності АФІ, крива 4)

Водночас, зразки що містять CaCl_2 (помаранчевий та жовтий графіки), демонструють характерне зростання сигналу, що відповідає активній фазі утворення фібринових згустків. Помаранчева крива відображає типовий перебіг процесу коагуляції для позитивного контролю. Час настання реакції є наближеним до значень, які наводить виробник контрольної плазми, як очікуваний час настання реакції, що є важливим підтвердженням функціональності та надійності методики.

На противагу цьому, жовта крива, отримана для зразка що містить АФІ, демонструє чітку затримку перед початком коагуляції. Це свідчить про те, що АФІ впливає на ранні етапи каскаду реакцій згортання плазми крові. Той факт, що розроблена методика здатна виявляти та детектувати цю затримку, є дуже важливим. Оскільки підтверджує, що вона не просто фіксує сам факт коагуляції, а є достатньо чутливою, щоб реєструвати вплив досліджуваної речовини на кінетику процесу.

Крім того, максимальне значення сигналу на жовтій кривій значно вище, ніж на помаранчевій. Це явище пов'язане з впливом АФІ на кінцеву структуру фібринового згустку. Ймовірно, присутність АФІ призводить до утворення більш щільних, агрегованих або більшої кількості дрібних фібринових волокон, що, у свою чергу, спричиняє сильніше розсіювання світла та, відповідно, вищий сигнал зчитувача.

Таким чином, отримані результати однозначно підтверджують, що розроблена методика є специфічною та селективною для оцінки коагуляції і може використовуватися для аналізу зразків, що містять АФІ.

Вибір математичної моделі для аналізу кінетики коагуляції. Кінетика процесу коагуляції плазми крові, що реєструється за допомогою нефелометричних вимірювань, демонструє складну нелінійну динаміку. Отримані експериментальні дані являють собою часові ряди, що графічно відображаються у вигляді характерної S-подібної (сигмоїдальної) кривої. Дана крива є інтегральним відображенням багатостадійного біохімічного каскаду реакцій, що включає три фази: початкову лаг-фазу (ініціація), фазу експоненційного росту сигналу (формування згустку) та фінальну фазу виходу на плато (стабілізація структури згустку). Така складна природа процесу унеможливує його формульний аналіз за допомогою звичайних кінетичних моделей, зокрема моделей першого або другого порядку.

Тому, для об'єктивної валідації методики та порівняння кінетичних параметрів коагуляції за різних експериментальних умов (зокрема при дослідженні впливу АФІ) застосовано параметричне моделювання всієї кривої. Апроксимація повного профілю відповідною функцією перетворює дискретний масив вимірювань на компактний набір інформативних параметрів із чіткою фізичною чи біологічною інтерпретацією. Такий підхід є стійким до експериментального шуму та забезпечує відтворюваність у порівнянні з модель-незалежними методами, наприклад, чисельним диференціюванням.

Серед класичних функцій, що описують сигмоїдальну динаміку (логістична, Гомпертца чи Больцмана), для аналізу отриманих даних було обрано чотирипараметричну кумулятивну функцію розподілу Вейбулла. Цей вибір обґрунтований низкою суттєвих переваг даної моделі. Ключовою з них є її виняткова гнучкість, яка забезпечується наявністю параметра форми (β), що керує асиметрією та крутістю зростання. На відміну від симетричних сигмоїдальних функцій, модель Вейбулла здатна успішно описувати як симетричні, так і асиметричні кінетичні криві. Асиметрія є поширеною характеристикою біологічних процесів, де фази прискорення та уповільнення реакції можуть суттєво відрізнятися за своєю тривалістю та динамікою. Таким чином, модель Вейбулла дозволяє отримати більш точну апроксимацію експериментальних даних без систематичних похибок, властивих симетричним моделям.

Кожен із чотирьох параметрів моделі Вейбулла має пряму та зрозумілу інтерпретацію в контексті процесу коагуляції. Параметр затримки (τ) безпосередньо відповідає тривалості лаг-фази (затримки перед експоненційним зростанням), що є критично важливим показником часу згортання. Амплітуда (A) кількісно характеризує загальну зміну оптичного сигналу, що корелює зі щільністю, структурою та загальною масою утвореного фібринового згустку. Комбінація параметра масштабу (k) та параметра форми (β) комплексно описує динаміку фази росту – найважливішої стадії процесу. Ці параметри визначають, наскільки стрімко розвивається процес утворення фібринового згустку.

Так, для подальшого кількісного аналізу та опису нефелометричного сигналу $S(t)$ використано зміщену (за часом) і масштабовану (за амплітудою) кумулятивну функцію Вейбулла (1), де S_0 – базовий (початковий)

рівень сигналу. Така параметризація прямо відповідає фізіологічно змістовним характеристикам процесу (лаг-фаза, амплітуда зміни сигналу, масштаб і форма зростання) та забезпечує відтворюваність оцінок.

$$S(t) = \begin{cases} S_0 & , \text{якщо } t < \tau \\ S_0 + A \times (1 - e^{-k(t-\tau)^\beta}) & , \text{якщо } t \geq \tau \end{cases} \quad (1)$$

де $S_\infty = S_0 + A$ – рівень плато

Окрім того, значущою перевагою використання моделі Вейбулла є можливість аналітичного розрахунку на її основі похідних кінетичних параметрів, що мають високу фізіологічну значущість. Зокрема, на основі знайдених коефіцієнтів A , k та β можна точно розрахувати максимальну швидкість (2) реакції ($v_{\max}$) та час (3) її досягнення ($t_{v_{\max}}$). Розрахунок $v_{\max}$ аналітичним шляхом є значно надійнішим за чисельне диференціювання експериментальних даних, оскільки він нечутливий до локальних флуктуацій сигналу.

$$v_{\max} = \begin{cases} S_0 \times A & , \text{якщо } \beta \leq 1 \\ A \times k \times \beta \times \left(\frac{\beta-1}{k \times \beta}\right)^{\frac{\beta-1}{\beta}} \times e^{-\frac{\beta-1}{\beta}} & , \text{якщо } \beta > 1 \end{cases} \quad (2)$$

$$t_{v_{\max}} = \begin{cases} \tau & , \text{якщо } \beta \leq 1 \\ \tau + \left(\frac{\beta-1}{k \times \beta}\right)^{\frac{1}{\beta}} & , \text{якщо } \beta > 1 \end{cases} \quad (3)$$

Таким чином, використання моделі Вейбулла не лише забезпечує відмінну якість апроксимації даних, але й слугує основою для подальшого розрахунку ключових кінетичних дескрипторів. У підсумку, обраний підхід дозволяє провести всебічний та кількісно обґрунтований аналіз впливу досліджуваного АФІ на ініціацію, швидкість та кінцевий результат процесу формування фібринового згустку.

Дослідження робастності методики. Стійкість методики до змін умов виконання оцінюється через її здатність зберігати надійність та точність результатів при незначних навмисних змінах параметрів процедури. Така перевірка дозволяє встановити, наскільки метод є придатним для рутинного застосування в лабораторній практиці, навіть за умов варіативності, яка може виникати в реальних умовах роботи. У рамках даного тесту, робастність нефелометричної методики оцінювали шляхом варіювання двох критичних параметрів: температури в камері для дослідження та тривалості одного вимірювання. Розрахунок максимальної швидкості реакції виконували за допомогою моделі Вейбулла.

Перший етап дослідження полягав у перевірці впливу коливань температури інкубації на стабільність показника $v_{\max}$. Аналіз проводили при трьох температурних режимах: 36,5 °C, 37,0 °C (номінальне значення) та 37,5 °C. Для кожної температури було виконано по три паралельних вимірювання. Результати представлено в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати дослідження Робастності методики при зміні оптимальної температури дослідження

Температура, °C	$v_{\max}$ № 1, alu/sec	$v_{\max}$ № 2, alu/sec	$v_{\max}$ № 3, alu/sec	Середнє значення, alu/sec	Стандартне відхилення	Стандартне відхилення, %
36,5	153,000	170,000	159,000	160,667	8,622	5,366
37,0	165,000	160,000	173,000	166,000	6,557	3,950
37,5	154,000	158,000	164,000	158,667	5,033	3,172
Підсумок 3-х вимірів				161,778	3,791	2,343

Отримані значення показують, що середні значення $v_{\max}$, одержані при температурах 36,5 °C, 37,0 °C та 37,5 °C, є подібними між собою (160,667 alu/sec; 166,000 alu/sec; 158,667 alu/sec). Загальне відносне стандартне відхилення (RSD) для всіх дев'яти вимірювань становить 2,343 %, що є низьким показником і свідчить про незначний вплив коливань температури в межах $\pm 0,5$ °C на кінцевий результат.

Далі було досліджено, вплив зміни тривалості одного вимірювання на результат аналізу. Були обрані три значення тривалості: 0,9 с, 1,0 с (номінальне значення) та 1,1 с. Як і в попередньому експерименті, для кожного значення параметра було проведено по три дослідження кожного параметру. Результати наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати дослідження Робастності методики при зміні оптимального часу вимірювання

Тривалість одного вимірювання, с	$v_{\max}$ № 1, alu/sec	$v_{\max}$ № 2, alu/sec	$v_{\max}$ № 3, alu/sec	Середнє значення, alu/sec	Стандартне відхилення	Стандартне відхилення, %
0,9	164,000	159,000	171,000	164,667	6,028	3,661
1,0	175,000	163,000	164,000	167,333	6,658	3,979
1,1	161,000	154,000	170,000	161,667	8,021	4,961
Підсумок 3-х вимірів				164,556	2,835	1,723

Аналіз результатів показує, що середні значення $v_{\max}$ при різній тривалості вимірювання є близькими (164,667 alu/sec; 167,333 alu/sec; 161,667 alu/sec). Сумарне відносне стандартне відхилення для всіх вимірювань

становить 1,723 %. Це дуже низьке значення, яке підтверджує, що незначні зміни в тривалості вимірювання (в межах $\pm 0,1$ с) не спричиняють значущих відхилень у результатах.

Проведене дослідження підтвердило робастність розробленої нефелометричної методики. Встановлено, що навмисні незначні варіації ключових параметрів – температури в камері для вимірювання (в діапазоні 36,5–37,5 °C) та тривалості вимірювання (в діапазоні 0,9–1,1 с) – не спричиняють статистично значущих змін у кінцевих результатах. Це підтверджується низькими значеннями сукупного відносного стандартного відхилення (RSD), які склали 2,343 % для варіації температури та 1,723 % для варіації часу.

Таким чином, методика є стійкою до незначних коливань умов аналізу, що свідчить про її надійність та придатність для рутинного застосування в лабораторній практиці.

Доведення прецизійності. Прецизійність є одним із фундаментальних валідаційних критеріїв, що кількісно характеризує ступінь розсіювання результатів, отриманих при багаторазовому аналізі зразка. Оцінка прецизійності проводиться на кількох рівнях для всебічної характеристики методики. Перший рівень, збіжність (repeatability або внутрішньосерійна прецизійність), характеризує розкид результатів, отриманих одним аналітиком протягом короткого проміжку часу з використанням того самого обладнання. Другий рівень, внутрішньолабораторна прецизійність (intermediate precision), оцінює вплив варіацій умов у межах однієї лабораторії, таких як зміна аналітика, дня проведення аналізу або партії реактивів, що дозволяє прогнозувати стабільність методики в рутинній роботі.

У рамках даного дослідження було проведено комплексну оцінку прецизійності на обох зазначених рівнях. Для цього два незалежні виконавці (Аналітик 1 та Аналітик 2) провели по дев'ять вимірювань в різні дні (таблиця 3) на зразках із номінальною концентрацією активної речовини 9 мкМ/л. Оцінювали два ключові кінетичні параметри: час затримки коагуляції (τ), виражений у секундах, та максимальну швидкість процесу ($v_{\max}$), виражену в рівні сигналу зчитувача за одиницю часу (alu/sec). У таблиці 3 наведено первинні дані вимірювань, а також розраховані статистичні показники: середнє значення (Z), стандартне відхилення (SZ), відносне стандартне відхилення (RSD, %), та довірчі інтервали, що характеризують збіжність і відтворюваність методики.

Таблиця 3

Результати дослідження прецизійності методики

Параметр	Аналітик 1	Аналітик 2	Аналітик 1	Аналітик 2
	Час затримки (τ), с		Максимальна швидкість ($v_{\max}$), alu/sec	
1 (C=9 мкМ)	662,341	670,928	26,972	27,524
2 (C=9 мкМ)	676,645	682,673	29,275	28,049
3 (C=9 мкМ)	710,259	650,521	30,562	25,933
4 (C=9 мкМ)	702,873	640,672	29,630	23,631
5 (C=9 мкМ)	688,592	710,876	30,019	31,097
6 (C=9 мкМ)	693,761	693,325	26,721	29,533
7 (C=9 мкМ)	662,568	715,743	27,190	30,027
8 (C=9 мкМ)	703,472	721,152	31,040	28,413
9 (C=9 мкМ)	730,366	694,541	33,009	29,212
Середнє значення, Z	692,320	686,715	29,380	28,158
Стандартне відхилення, S_Z	22,502	28,312	2,106	2,265
Стандартне відхилення, S_Z , %	3,250	4,123	7,167	8,045
Збіжність, довірчий інтервал, Δ_z , %	2,498	3,162	5,509	6,184
Відтворюваність, довірчий інтервал, Δ_z , %	1,810		3,843	

Аналіз даних для параметра часу затримки коагуляції (τ) показав високу збіжність результатів. Середні значення, отримані Аналітиком 1 (692,320 с) та Аналітиком 2 (686,715 с), є дуже близькими, що вказує на низьку міжсерійну варіабельність. Відносні стандартні відхилення (RSD), що характеризують внутрішньосерійну прецизійність, склали 3,250 % та 4,123 % відповідно. Такі низькі показники RSD підтверджують високу збіжність методики. Внутрішньолабораторна прецизійність, оцінена через довірчий інтервал відтворюваності, також знаходиться в прийнятних межах (1,810 %), що свідчить про надійність методики при зміні виконавця.

Для параметра максимальної швидкості процесу ($v_{\max}$) середні значення становили 29,380 alu/sec для Аналітика 1 та 28,158 alu/sec для Аналітика 2. Відносні стандартні відхилення для цього параметра були вищими і склали 7,167 % та 8,045 % відповідно. Це може пояснюватися більшою чутливістю кінетичного параметра $v_{\max}$ до мінімальних флуктуацій умов експерименту. Незважаючи на це, отримані значення RSD не перевищують критеріїв прийнятності для біоаналітичних методів (до 15 %). Довірчий інтервал відтворюваності для $v_{\max}$ (3,843 %) також підтверджує, що методика залишається стабільною при виконанні аналізу різними аналітиками.

Таким чином, результати проведеного дослідження дозволяють зробити висновок про високу прецизійність розробленої методики. Було продемонстровано як відмінну збіжність результатів у межах однієї серії вимірювань, так і високу внутрішньолабораторну прецизійність при зміні аналітика. Усі розраховані статистичні показники, зокрема відносні стандартні відхилення та довірчі інтервали, знаходяться в межах допустимих норм для даного типу аналізу. Це підтверджує надійність, відтворюваність та придатність

методики для рутинного використання в лабораторній практиці.

Тестування лінійності. Лінійність є одним із ключових параметрів валідації аналітичної методики. Вона характеризує здатність методики в межах визначеного діапазону концентрацій давати результати, які є пропорційними концентрації аналіту в зразку. Перевірка лінійності дозволяє встановити робочий діапазон методики, в якому аналітичний сигнал достовірно відображає кількість досліджуваної речовини. Статистичну обробку проводять за допомогою методу найменших квадратів для побудови рівняння лінійної регресії та розрахунку коефіцієнта детермінації (R^2), що є мірою адекватності лінійної моделі.

Для оцінки лінійності даної методики було проаналізовано серію зразків із трьома різними концентраціями ривароксабану: 5,0 мкМ, 10,0 мкМ та 15,0 мкМ. Для кожної концентрації було проведено по три паралельні вимірювання аналітичного сигналу з подальшим розрахунком максимальної швидкості коагуляції ($v_{\max}$) за моделлю Вейбулла. Отримані експериментальні дані були використані для побудови калібрувального графіка та розрахунку параметрів регресійної моделі. Результати вимірювання наведені в таблиці 4.

Таблиця 4

Результати вимірювань за показником «Лінійність»

Показник	Концентрація ривароксабану, мкМ		
	5,0	10,0	15,0
Максимальна швидкість коагуляції, alu/sec, вимір 1	52,030	32,220	22,710
Максимальна швидкість коагуляції, alu/sec, вимір 2	54,970	37,100	25,140
Максимальна швидкість коагуляції, alu/sec, вимір 3	52,390	30,790	26,050
Середнє значення вимірів	53,130	33,370	24,633
Відхилення	1,604	3,308	1,727
Значення за рівнянням регресії	51,293	37,044	22,796
Стандартне відхилення	1,299	2,598	1,300
Стандартне відносне відхилення, %	2,533	7,014	5,699
Сума квадратів відхилень	20,252		
Залишкове стандартне відхилення, S_0	4,501		

Аналіз отриманих результатів показав, що зі зростанням концентрації ривароксабану спостерігається закономірне зменшення максимальної швидкості коагуляції, що відображає фармакологічний механізм дії препарату як інгібітора фактора Ха. Близькість експериментальних середніх значень (53,130; 33,370; 24,633 alu/sec) до значень, розрахованих за рівнянням регресії (51,293; 37,044; 22,796 alu/sec), підтверджує адекватність побудованої лінійної моделі. Важливим параметром якості регресії є залишкове стандартне відхилення (S_0), яке характеризує середній розкид експериментальних точок навколо лінії регресії. У даному випадку його значення становить 4,501, що є прийнятним рівнем для біоаналітичних методик.

На калібрувальному графіку (рис. 3) чітко простежується обернена лінійна залежність між концентрацією ривароксабану та швидкістю коагуляції. Експериментальні точки добре апроксимуються прямою лінією, що візуально підтверджує відгук методики. Математично ця залежність описується рівнянням регресії $y = -2,8497x + 65,541$ з коефіцієнтом детермінації $R^2 = 0,9525$. Це означає, що 95,25 % варіації аналітичного сигналу пояснюється зміною концентрації ривароксабану, що вказує на високу надійність і відтворюваність моделі та відповідність вимогам валідації.

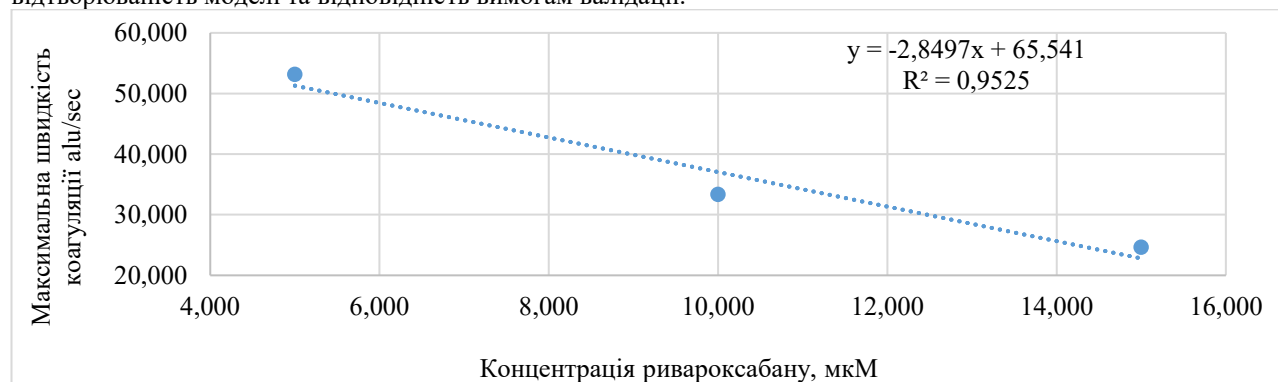


Рис. 3. Графік залежності максимальної швидкості коагуляції (alu/sec) від концентрації ривароксабану

Проведене тестування лінійності показало наявність чіткої оберненої залежності між концентрацією ривароксабану та максимальною швидкістю коагуляції плазми. Отримане рівняння регресії з коефіцієнтом детермінації $R^2 = 0,9525$ та прийнятним значенням залишкового стандартного відхилення підтверджує адекватність і відтворюваність моделі. Це свідчить про відповідність методики критеріям лінійності у дослідженому діапазоні концентрацій.

Висновки з дослідження і перспективи подальших розвідок у даному напрямі

За результатами проведеного дослідження була успішно валідована нефелометрична методика із застосуванням математичної моделі для оцінки впливу ривароксабану на кінетику коагуляції плазми крові. Було доведено, що методика є функціонально придатною, специфічною та селективною, оскільки вона не лише адекватно реєструє процес утворення фібринового згустку, а й демонструє високу чутливість до інгібуючої дії досліджуваного антикоагулянту. Обґрунтований вибір чотирьохпараметричної кумулятивної функції Вейбулла як математичної моделі, що дозволило точно апроксимувати S-подібну динаміку процесу та розраховувати ключові параметри, такі як час затримки коагуляції (τ) та максимальна швидкість реакції ($v_{\max}$).

Методика продемонструвала високу робастність до незначних коливань температури та часу вимірювання, а також відмінну прецизійність на рівнях збіжності та внутрішньолaboratorної відтворюваності, що підтверджує її надійність для рутинного використання. Встановлення чіткої оберненої залежності між концентрацією ривароксабану та швидкістю коагуляції з високим коефіцієнтом детермінації ($R^2 = 0,9525$) остаточно підтвердило її придатність для кількісного аналізу.

Таким чином, валідована нефелометрична методика є точним, надійним та відтворюваним інструментом, що відкриває значні перспективи для подальших досліджень. Першочерговим завданням є її практичне застосування для порівняльного аналізу інноваційних лікарських форм ривароксабану, зокрема твердих дисперсних систем, для оцінки покращення їхніх біофармацевтичних властивостей.

Література

15. Metre, S., Mukesh, S., Samal, S. K., Chand, M., & Sangamwar, A. T. (2018). Enhanced biopharmaceutical performance of rivaroxaban through polymeric amorphous solid dispersion. *Molecular pharmaceutics*, 15(2), 652-668. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b01027.
16. Shah, P. J., Patel, M. P., Shah, J., Nair, A. B., Kotta, S., & Vyas, B. (2022). Amalgamation of solid dispersion and melt adsorption techniques for augmentation of oral bioavailability of novel anticoagulant rivaroxaban. *Drug Delivery and Translational Research*, 12(12), 3029-3046. doi: 10.1007/s13346-022-01168-9.
17. Alburyhi, M. M., Hamidaddin, M. A., Saif, A. A., & Noman, M. A. (2024). Formulation and Evaluation of Rivaroxaban Orodispersible Tablets. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 2066-2092. doi: 10.20959/wjpps20242-26698
18. Федоренко, В., Бегдай, А., Яременко, В., Чорний, О., & Гой, А. (2025). Розробка нефелометричної методики визначення коагуляції плазми крові. *Herald of Khmelnytskyi National University. Technical sciences*, 349(2), 585-590. doi: 10.31891/2307-5732-2025-349-85
19. Bakhru, S. H., Jiang, X., Chen, L., Osmani, D., Kronen, K., Mootoo, D., ... & Ansell, J. (2025). Validation of a whole blood coagulometer sensitive to the direct oral anticoagulants. *Scientific Reports*, 15(1), 7355. doi: 10.1038/s41598-025-92201-7.
20. Baldelli, S., Cattaneo, D., Pignatelli, P., Perrone, V., Pastori, D., Radice, S., ... & Clementi, E. (2016). Validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of dabigatran, rivaroxaban and apixaban in human plasma. *Bioanalysis*, 8(4), 275-283. doi: 10.4155/bio.15.261
21. Douxflis, J., Mani, H., Minet, V., Devalet, B., Chatelain, B., Dogné, J. M., & Mullier, F. (2015). Non-VKA oral anticoagulants: accurate measurement of plasma drug concentrations. *BioMed research international*, 2015(1), 345138. doi: 10.1155/2015/345138
22. Taune, V., Wallén, H., Ågren, A., Gryfelt, G., Sjövik, C., Wintler, A. M., ... & Skeppholm, M. (2017). Whole blood coagulation assays ROTEM and T-TAS to monitor dabigatran treatment. *Thrombosis research*, 153, 76-82. doi: 10.1016/j.thromres.2017.03.018.
23. Farm, M. (2020). *New diagnostic approaches for venous thromboembolism and thrombophilia* (Publication № 28421671) [Doctoral dissertation, Karolinska Institutet]. PQDT Open. <https://openarchive.ki.se/articles/thesis>.
24. Biró, E., Molnár-Világos, Gy., & Kocsis, I. (2014). Switching between methodologies for free light chains measurement: the risk of uncomparable results. Ajzner, É., Antal-Szalmás, P., Bereczky, Z., Sándor, J., & Vászárhelyi, B. (Eds.), *57th National Congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine: August 28-30, (p.8)*. <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/cclm-2014-0679/html>.
25. Fischer, L., Miklós, K., Hartvig, N., Simon, J., & Szabó, Z. (2016). Kappa free light chain in the central nervous system. Földesi, I., Bereczky, Z., Jost, K., Kőszegi, T., Ónody, R., Siska, A., & Vászárhelyi, B. (Eds.) *58th National Congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine. August 9, (p.34)*. <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/cclm-2016-0583/html>
26. Taune, V. (2022). *Effects of direct oral anticoagulant treatment on hemostasis in patients with atrial fibrillation*. (Publication № 30254607) [Doctoral dissertation, Karolinska Institutet]. PQDT Open. <https://openarchive.ki.se/articles/thesis>.
27. Radek, J., Birkner-Krackowizer, P., Gruber, I., Ambrus, E., Schuhmeister, D., Leixner, G., Hopmeier, P., Haushofer, A., & Trubert-Exinger, D. (2018). Heavy / light chain assay versus other quantitative methods for the diagnosis of IgM multiple myeloma Patients. Haushofer, A. (Eds.). *Congress of Laboratory Medicine and Clinical Chemistry 7th Annual Meeting of the Austrian Society for Laboratory Medicine and Clinical Chemistry (ÖGLMKC). November 20-23, (p. A16)*. <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/cclm-2018-1045/html>.

References

1. Metre, S., Mukesh, S., Samal, S. K., Chand, M., & Sangamwar, A. T. (2018). Enhanced biopharmaceutical performance of rivaroxaban through polymeric amorphous solid dispersion. *Molecular pharmaceutics*, 15(2), 652-668. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b01027.
2. Shah, P. J., Patel, M. P., Shah, J., Nair, A. B., Kotta, S., & Vyas, B. (2022). Amalgamation of solid dispersion and melt adsorption techniques for augmentation of oral bioavailability of novel anticoagulant rivaroxaban. *Drug Delivery and Translational Research*, 12(12), 3029-3046. doi: 10.1007/s13346-022-01168-9.
3. Alburyhi, M. M., Hamidaddin, M. A., Saif, A. A., & Noman, M. A. (2024). Formulation and Evaluation of Rivaroxaban Orodispersible Tablets. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 2066-2092. doi: 10.20959/wjpps20242-26698
4. Fedorenko, V., Behdai, A., Yaremenko, V., Chorniy O., & Goy A. (2025). Development of a nephelometric method for determining blood plasma coagulation *Herald of Khmelnytskyi National University. Technical sciences*, 349(2), 585-590. doi: 10.31891/2307-5732-2025-349-85
5. Bakhru, S. H., Jiang, X., Chen, L., Osmani, D., Kronen, K., Mootoo, D., ... & Ansell, J. (2025). Validation of a whole blood coagulometer sensitive to the direct oral anticoagulants. *Scientific Reports*, 15(1), 7355. doi: 10.1038/s41598-025-92201-7.
6. Baldelli, S., Cattaneo, D., Pignatelli, P., Perrone, V., Pastori, D., Radice, S., ... & Clementi, E. (2016). Validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of dabigatran, rivaroxaban and apixaban in human plasma. *Bioanalysis*, 8(4), 275-283. doi: 10.4155/bio.15.261
7. Douxflis, J., Mani, H., Minet, V., Devalet, B., Chatelain, B., Dogné, J. M., & Mullier, F. (2015). Non-VKA oral anticoagulants: accurate measurement of plasma drug concentrations. *BioMed research international*, 2015(1), 345138. doi: 10.1155/2015/345138
8. Taune, V., Wallén, H., Ågren, A., Gryfelt, G., Sjövik, C., Wintler, A. M., ... & Skeppholm, M. (2017). Whole blood coagulation assays ROTEM and T-TAS to monitor dabigatran treatment. *Thrombosis research*, 153, 76-82. doi: 10.1016/j.thromres.2017.03.018.
9. Farm, M. (2020). *New diagnostic approaches for venous thromboembolism and thrombophilia* (Publication № 28421671) [Doctoral dissertation, Karolinska Institutet]. PQDT Open. <https://openarchive.ki.se/articles/thesis>.
10. Biró, E., Molnár-Világos, Gy., & Kocsis, I. (2014). Switching between methodologies for free light chains measurement: the risk of uncomparable results. Ajzner, É., Antal-Szalmás, P., Bereczky, Z., Sándor, J., & Vásárhelyi, B. (Eds.), *57th National Congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine: August 28-30, (p.8)*. <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/cclm-2014-0679/html>.
11. Fischer, L., Miklós, K., Hartvig, N., Simon, J., & Szabó, Z. (2016). Kappa free light chain in the central nervous system. Földesi, I., Bereczky, Z., Jost, K., Kőszegi, T., Ónody, R., Siska, A., & Vásárhelyi, B. (Eds.) *58th National Congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine. August 9, (p.34)*. <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/cclm-2016-0583/html>
12. Taune, V. (2022). *Effects of direct oral anticoagulant treatment on hemostasis in patients with atrial fibrillation*. (Publication № 30254607) [Doctoral dissertation, Karolinska Institutet]. PQDT Open. <https://openarchive.ki.se/articles/thesis>.
13. Radek, J., Birkner-Krackowizer, P., Gruber, I., Ambrus, E., Schuhmeister, D., Leixner, G., Hopmeier, P., Haushofer, A., & Trubert-Exinger, D. (2018). Heavy / light chain assay versus other quantitative methods for the diagnosis of IgM multiple myeloma Patients. Haushofer, A. (Eds.). *Congress of Laboratory Medicine and Clinical Chemistry 7th Annual Meeting of the Austrian Society for Laboratory Medicine and Clinical Chemistry (ÖGLMKC). November 20-23, (p. A16)*. <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/cclm-2018-1045/html>.