

ОБ ОЦЕНКЕ КОНТАМИНАЦИИ И АНАЛИЗЕ КОНТРОЛЬНЫХ ПРОБ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ТОКСИКОКИНЕТИКИ

Косман В. М., Карлина М. В., Петрова Е. М., Макарова М. Н.,
Макаров В. Г.

Акционерное общество «Научно-производственное объединение
“Дом Фармации”», г. п. Кузьмоловский, Ленинградская область,
Россия

Контактная информация:

Косман Вера Михайловна,
АО «НПО «Дом Фармации»,
Заводская ул., д. 3, корп. 245, г. п.
Кузьмоловский, Ленинградская область,
Россия, 188663.
E-mail: kosman.vm@doclinika.ru

Статья поступила в редакцию 18.05.2024
и принята к печати 11.08.2024.

Резюме

Актуальность. Оценка контаминации контрольных образцов является необходимым элементом подтверждения корректности исследований токсикокинетики (ТК), сопутствующим изучению токсичности лекарственных веществ и препаратов. Вместе с тем недостаточная проработка действующих регуляторных документов обуславливает необходимость обсуждения практических аспектов и совершенствования регуляторной базы. **Цель.** Работа посвящена рассмотрению экспериментального опыта по оценке контаминации контрольных проб в исследованиях ТК. **Материалы и методы.** В качестве экспериментальных примеров рассмотрены два исследования ТК лекарственных препаратов, выполненные с использованием самцов и самок кроликов при пероральном введении исследуемых препаратов в течение 28 (исследование 1) или 90 (исследование 2) дней. **Результаты.** В исследовании 1 выявлен уровень контаминации 17–25 % (в первый и последний дни введения исследуемого препарата соответственно). Контаминация биопроб происходит *in vivo* (контаминация организма животного) и *ex vivo* (на этапе забора биопроб, на преаналитическом и аналитическом этапах). Характер обнаружения аналита в пробах позволил исключить контаминацию *in vivo*, результаты внутреннего расследования позволили предположить, что она происходила на этапе отбора биопроб. В исследовании 2 реализован ряд профилактических мер и получен незначительный уровень контаминации (0,83 %), не оказавший влияния на полноту и корректность интерпретации результатов. **Заключение.** На основании экспериментального опыта сформулированы рекомендации по минимизации и профилактике контаминации контрольных образцов при выполнении биологической части, преаналитического и аналитического этапов исследований. Предположительно, при наличии случайного характера загрязнений, свидетельствующего о его *ex vivo* происхождении, уровень контаминации, не превышающий 25 %, можно считать незначительным, то есть не ведущим к дальнейшему отклонению и аннуляции результатов всего исследования.

Ключевые слова: аннулирование результатов исследования, контаминация, регуляторные документы, токсикокинетика.

Для цитирования: Косман В.М., Карлина М.В., Петрова Е.М. и др. Об оценке контаминации и анализе контрольных проб в исследованиях токсикокинетики. *Трансляционная медицина*. 2024; 11(4): 351-363. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-351-363. EDN: FWCXVC

ON THE ASSESSMENT OF CONTAMINATION AND ANALYSIS OF CONTROL SAMPLES IN TOXICOKINETICS STUDIES

Vera M. Kosman, Marina V. Karlina, Elizaveta M. Petrova,
Marina N. Makarova, Valery G. Makarov

Research and manufacturing company “Home of Pharmacy”,
Kuzmolovsky settlement, Leningrad Region, Russia

Corresponding author:

Vera M. Kosman,
RMC “Home of Pharmacy”,
Zavodskaya str., 3, building 245,
Kuzmolovsky settlement, Leningrad Region,
Russia, 188663.
E-mail: kosman.vm@doclinika.ru

Received 18 May 2024; accepted 11 August
2024.

Abstract

Relevance. The evaluation of control samples contamination is a necessary element for confirming the correctness of toxicokinetic studies (TK), concomitant with the study of toxicity of drugs and products. At the same time, insufficient elaboration of existing regulatory documents necessitates discussion of practical aspects and improvement of the regulatory framework. **Purpose.** The work is devoted to the consideration of experimental experience of control samples contamination in TK studies. **Materials and methods.** As experimental examples, two studies of TK drugs performed using rabbits with oral administration of study drugs for 28 (Study 1) or 90 (Study 2) days were considered. **Results.** Study 1 revealed a contamination level of 17–25 % (on the first and last days of study drug administration, respectively). Contamination of bioassays can occur *in vivo* (contamination of animals) and *ex vivo* (at the stage of bioassay sampling, at the pre-analytical stage and analytical stage). The nature of the analyte detection in the samples made it possible to exclude contamination *in vivo*, and the results of an internal investigation suggested that it occurred at the stage of biosample selection. In Study 2, a number of preventive measures were implemented and a slight level of contamination was obtained (0.83 %), which did not affect the completeness and correctness of results interpretation. **Conclusion.** Based on experimental experience, recommendations for minimizing and preventing contamination of control samples during the biological part, pre-analytical and analytical stages of studies were formulated. Presumably, in the presence of a random nature of contamination indicating its *ex vivo* origin, the level of contamination not exceeding 25 % can be considered insignificant, i.e. not leading to further deviation and cancellation of the results of the entire study.

Key words: cancellation of study results, contamination, regulatory documents, toxicokinetics.

For citation: Kosman VM, Karlina MV, Petrova EM, et al. On the assessment of contamination and analysis of control samples in toxicokinetics studies. Translational Medicine. 2024; 11(4): 351-363. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-351-363. EDN: FWCXVC

Список сокращений: БЭК — биоэтическая комиссия, ВЭЖХ-МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием, КК — контроль качества, НПКО — нижний предел количественного определения, ТК — токсикокинетика, ФК — фармакокинетика, М — среднее значение, SD — стандартное отклонение, SEM — стандартная ошибка среднего.

Введение

Согласно действующим в настоящее время регуляторным документам¹ одной из составляющих комплекса доклинических исследований, необходимых для создания и регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения, является оценка их токсикокинетики (ТК). Изучение ТК направлено на оценку системной экспози-

ции и получение фармакокинетических данных, которые используют для интерпретации результатов токсикологических исследований и их значимости для клинической безопасности¹. Таким образом, оценка ТК является составной частью изучения токсичности лекарственных субстанций и препаратов. Основные отличия исследований ТК от изучения фармакокинетики (ФК) связаны с применением значительно более высоких доз и схем введения, отличающихся от планируемых в клинической практике (как правило, при оценке ТК используется ежедневное введение в течение сравнительно длительного периода: 28–90–180 и более дней) [1]. Кроме того, при рассмотрении результатов основной акцент направлен не на характеристику фармакокинетических параметров изучаемого соединения, а на интерпретацию данных токсичности [1, 2]¹.

При изучении токсичности и ТК регуляторными документами предусмотрена оценка контаминации контрольной группы животных исследуемым веществом². Для этого у животных контрольной группы, предусмотренной дизайном исследования по оценке токсичности (не получающей лекарственный препарат и/или получающей плацебо), необходимо провести отбор образцов биоматериала по той же схеме, что для животных экспериментальных групп².

Значительная контаминация, выявленная по результатам анализа контрольных образцов, может привести к аннулированию результатов всего токсикологического исследования². Регуляторные документы указывают на необходимость расследования потенциальных источников загрязнения при наличии существенной контаминации,

принятия корректирующих мер и включения информации о контаминации в отчетные документы². Вместе с тем, действующие регуляторные документы не содержат информации о том, какой уровень контаминации следует считать значительным, критичным и обуславливающим аннуляцию всех полученных в исследовании результатов, а в каких ситуациях можно обосновать незначительное его влияние на обработку данных и интерпретацию итогов работы.

Крайне ограниченное число публикаций по данному вопросу свидетельствует об актуальности более открытого его обсуждения, обмена мнениями и опытом практического решения, что позволило бы в дальнейшем выработать более конкретные критерии и рекомендации.

Цель данной работы — рассмотрение экспериментального опыта по оценке контаминации контрольных проб в исследованиях токсикокинетики.

Материалы и методы

В качестве экспериментальных примеров в работе рассмотрены два исследования ТК лекарственных препаратов, выполненные в АО «НПО «Дом Фармации» в 2022 году.

В экспериментах были использованы кролики породы советская шиншилла (исследование 1) или новозеландский белый (исследование 2) обоих полов (питомник ФГУП «Опытно-промышленное хозяйство «Манихино» — исследование 1 или ООО «АГРО СПЕЦ СЕРВИС», Россия — исследование 2). Возраст животных к началу эксперимента составил 14–16 недель или 17–18 недель для исследований 1 и 2 соответственно. Проведение исследований было одобрено на заседании биоэтической

¹ Рекомендации ЕАЭК № 33 от 22.12.2020 «О Руководстве по изучению токсикокинетики и оценке системного воздействия в токсикологических исследованиях лекарственных препаратов».

Рекомендации ЕАЭК № 10 от 21.05.2020 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения».

ICH Topic S 3 A Toxicokinetics: a guidance for assessing systemic exposure in toxicology studies. (CPMP/ICH/384/95). https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-s-3-toxicokineticsguidance-assessing-systemic-exposure-toxicology-studies-step-5_en.pdf. (21 May 2024).

S3A Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/s3a-toxicokinetics-assessment-systemic-exposure-toxicity-studies> (21 May 2024).

² Рекомендации ЕАЭК № 10 от 21.05.2020 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения».

Guideline on evaluation of control samples in nonclinical safety studies: checking for contamination with the test substance. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), London, UK (2005). www.ema.europa.eu (21 May 2024).

Таблица 1. Дизайн исследований

Table 1. Research design

Параметр	Исследование 1	Исследование 2
Общее число животных (код исследования)	40 самцов и 40 самок кроликов (БЭК 3.19/22)	48 самцов и 48 самок кроликов (БЭК 2.35/22)
Количество групп, количество животных в группе	четыре группы по 10 самцов и 10 самок	четыре группы по 12 самцов и 12 самок
Количество животных из каждой группы для ТК исследования (код исследования)	по 5 самцов и 5 самок из каждой группы животных (БЭК 1.19/22)	по 6 самцов и 6 самок из каждой группы животных (БЭК 3.35/22)
Введение тестируемых препаратов животным групп 2, 3 и 4*	1, 3 и 6 таблеток в день	1, 5 и 10 таблеток в день
Длительность введения	28 дней	90 дней
Отбор биоматериала для изучения ТК**	на 1–2 сутки и 28–29 сутки эксперимента на следующих временных точках: до введения препарата, через 15, 30, 45 мин., 1, 2, 3, 4, 8 и 24 ч. после введения тестируемого препарата	на 1–2 сутки и 90–91 сутки эксперимента на тех же временных точках

Примечания: * — введение осуществляли без разрушения готовой лекарственной формы препарата, перорально, многократно, один раз в день. Животным контрольной группы (группа 1) осуществляли имитацию введения — в ротовую полость вводили пустой таблеткодаватель.

** — отбор проб у животных группы 1 (по той же схеме, что и для групп 2–4 в первый и последний дни эксперимента) был предусмотрен для анализа возможной контаминации согласно рекомендациям ЕАЭК № 10 от 21.05.2020 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения». www.ema.europa.eu.

Note: * — The administration was carried out without destroying the finished dosage form of the drug, orally, repeatedly, once a day. Animals of the control group (group 1) underwent simulated administration — an empty tablet dispenser was injected into the oral cavity.

** — sampling from animals of groups 1 (according to the same scheme as for groups 2–4 on the first and last days of the experiment) was provided for the analysis of possible contamination according to the recommendations Guideline on evaluation of control samples in nonclinical safety studies: checking for contamination with the test substance. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), London, UK (2005).

комиссии (БЭК) АО «НПО «Дом Фармации» (протоколы БЭК от 19.05.2022 № 1.19/22 и 3.19/22 для исследования 1 и от 03.08.2022 № 2.35/22 и 3.35/22 для исследования 2).

Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях, и в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14.

Кроликов содержали в индивидуальных боксах с решетчатым полом без подстила, с зоной для отдыха (сплошной пол), снабженных автоматической nipple-системой поения. Минимальная площадь пола на одно животное соответствовала нормативной документации³.

Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды (16–22 °С, относительная влажность воздуха 30–70 %, NH₃ ≤ 10 мг/м³, CO₂ ≤ 0,15 об. %). Световой режим составил 12 часов света и 12 часов темноты. Был установлен режим

³ Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. 8-е изд. / Пер. с англ. под ред. И. В. Белозерцевой, Д. В. Блинова, М. С. Красильщиковой. М.: ИРБИС, 2017.

воздухообмена, обеспечивающий смену около 15 объемов помещения в час.

Стандартный корм животные получали *ad libitum*, за исключением лишения утреннего кормления перед забором крови. Воду кролики получали без ограничений.

Тестируемые препараты (в исследованиях 1 и 2 изучены разные объекты) не имеют принципиального значения для предмета обсуждаемой работы, поэтому сведения о них, являющиеся конфиденциальной информацией, в статье не представлены.

Дизайн исследований был построен с учетом современных норм биоэтики и соблюдения основных принципов «3Rs» (Replacement, Reduction, Refinement: замещение, сокращение, совершенствование) с использованием минимального количества животных⁴. Поэтому биологическая часть исследований ТК (введение тестируемого препарата, взятие образцов биоматериала и т. д.) выполнена в рамках исследований токсичности и фармакологической безопасности препаратов при многократном пероральном введении кроликам с периодом отсроченного наблюдения. Дизайн исследований представлен в таблице 1.

Образцы крови кроликов отбирали из краевой вены уха с помощью внутривенного катетера, в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА К2/К3, пробирки IMPROVACUTER, Guangzhou Improve Medical Instruments Co., LTD, Китай) в объеме 2 мл на каждую временную точку с последующим получением плазмы крови центрифугированием 15 минут при 3000 об/мин (центрифуга ОПН-8, ОАО ТНК «ДАСТАН», Киргизия, центрифуга лабораторная LMC-3000, ООО «BioSan», Латвия). Полученные образцы плазмы помещали в промаркированные пластиковые пробирки (типа «Эппендорф») и замораживали при температуре от -18 до -22 °С (морозильный ларь Liebherr GTP 2756, Liebherr, Германия).

Определение концентраций аналитов (действующих веществ препаратов, тестируемых в исследованиях 1 и 2) в биологических образцах с помощью предварительно валидированных (согласно рекомендациям⁵) методик проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектирова-

нием (ВЭЖХ-МС/МС). В исследовании 1 подготовка проб включала следующие манипуляции: в пластиковую центрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл (типа «Эппендорф») помещали 0,10 мл исследуемого образца, добавляли 10 мкл воды очищенной, 50 мкл раствора внутреннего стандарта и тщательно перемешивали с помощью орбитальной мешалки Vortex-GENIE G560E (Scientific industries INC, США). Затем добавляли 0,3 мл ацетонитрила (сорт 0, НПК «Криохром», Россия) и снова тщательно перемешивали в течение 5 минут с помощью орбитальной мешалки Vortex-GENIE G560E (Scientific industries INC, США). Пробирку центрифугировали в течение 5 минут при 14 000 об/мин (центрифуга Eppendorf minispin plus, Eppendorf AG, Германия). Надосадочный слой переносили в виалу для автодозатора и дозировали в ВЭЖХ-систему. Объем анализируемой пробы — 0,001 мл. Анализ выполнен методом градиентной обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС на хроматографе высокого давления LC-20 (Shimadzu, Япония) с автодозатором и масс-селективным детектором LCMS-8050 с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении. Линейный диапазон концентраций целевого аналита составил 0,2–508 нг/мл.

В исследовании 2 подготовка проб включала следующие манипуляции: в пластиковую центрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл (типа «Эппендорф») помещали 0,10 мл исследуемого образца, добавляли 10 мкл раствора внутреннего стандарта, 20 мкл 0,25 М гидроксида натрия (Scharlau, pellets, for analysis, ACS, Испания), 1000 мкл метил-трет-бутилового эфира (Biosolve, HPLC, Франция) и перемешивали в вортексе (Heidolph Multi Reax, Германия) в течение 2 минут при ~2000 об/мин. После этого образцы центрифугировали в течение 2 минут при 4400 об/мин (центрифуга Eppendorf Centrifuge, Германия). 900 мкл верхнего слоя переносили в виалу автодозатора и выпаривали в токе азота при температуре +40 °С (выпариватель TurboVar LV, США). К сухому остатку добавляли 300 мкл 50 % ацетонитрила (Sigma-Aldrich, HPLC, gradient grade, 99,9 %, Германия), закручивали крышкой и перемешивали в вортексе (Heidolph Multi Reax, Германия)

⁴ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / Миронов А.Н. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

⁵ ICH Q2A. Text on validation of analytical procedures. ICH harmonised tripartite guideline. Geneva; 1994.
ICH Q2B. Validation of analytical procedure: methodology. Geneva; 1996.
Bioanalytical method validation. Guidance for industry. FDA; 2018.
Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009. EMA; 2011.

в течение 2 минут при ~2000 об/мин. Полученную пробу (0,005 мл) дозировали в ВЭЖХ-систему. Анализ выполнен методом изократической обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС на хроматографе Shimadzu Prominence (Япония) с масс-спектрометром с электроспреей ионизацией и квадрупольным масс-анализатором Sciex (США). Линейный диапазон концентраций целевого анализа составил 0,2–50 нг/мл.

Более детальное рассмотрение условий ВЭЖХ-анализа, использованных внутренних стандартов, процедуры и результатов валидации методик не представлено, поскольку это является

конфиденциальной информацией и не имеет принципиального значения для предмета обсуждаемой работы.

Уровень контаминации определяли как число контрольных образцов (т. е. полученных от животных контрольной группы в каждом из исследований) с концентрацией анализа выше нижнего предела количественного определения (НПКО) используемой биоаналитической методики (для каждого из анализов в рассматриваемых исследованиях составил 0,2 нг/мл).

Для всех данных была применена описательная статистика, рассчитаны среднее значение

Таблица 2. Содержание анализа в плазме крови кроликов интактной группы в 1-й и 28-й дни эксперимента в исследовании 1, нг/мл

Table 2. Analyte content in the blood plasma of rabbits of the intact group on days 1 and 28 of the experiment in the study 1, ng/ml

Время, ч	Номер животного в группе										\bar{X}	SD	SEM
	1.6	1.7	1.8	1.9	1.10	1.16	1.17	1.18	1.19	1.20			
1-е введение													
0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
0,25	0,0	0,0	0,0	0,0	128,8	59,9	0,0	0,0	0,0	0,0	18,87	42,97	15,19
0,50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	99,2	0,0	252,5	67,5	41,92	82,04	29,01
0,75	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	849,4	132,3	0,0	459,8	158,1	159,96	282,75	99,97
1,00	0,0	0,0	0,0	359,6	53,7	135,9	0,0	0,0	487,3	91,0	112,75	172,97	61,16
2,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
4,00	109,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,93	34,56	12,22
6,00	68,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	479,1	0,0	0,0	0,0	54,77	150,64	53,26
8,00	105,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,54	33,33	11,78
24,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
28-е введение													
0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
0,25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
0,50	0,0	0,0	0,0	340,3	104,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	44,50	109,02	38,54
0,75	76,8	0,0	0,0	460,8	140,7	320,8	63,1	0,0	162,6	84,9	130,97	151,67	53,62
1,00	113,2	0,0	0,0	395,0	3212,8	358,3	131,3	0,0	675,2	108,7	499,45	978,08	345,80
2,00	0,0	0,0	0,0	2472,0	63,3	891,8	0,0	0,0	659,3	0,0	408,64	794,07	280,75
4,00	0,0	0,0	0,0	331,5	0,0	90,3	0,0	0,0	0,0	0,0	42,18	105,54	37,32
6,00	0,0	0,0	0,0	115,3	0,0	224,6	0,0	0,0	266,6	0,0	60,65	104,37	36,90
8,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
24,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00

(M), стандартное отклонение (SD) и стандартная ошибка среднего (SEM). Статистический анализ выполнен с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США).

Результаты и обсуждение

При выполнении исследования 1 целевой аналит (действующее вещество тестируемого препарата) был обнаружен в ряде проб, полученных от животных группы 1 в первый и последний дни введения (табл. 2).

Выявленный уровень контаминации составил 17–25 % (в 17 образцах из 100 в первый день введения и в 25 образцах из 100 в последний день введения, рис. 1), что побудило нас проанализировать возможные причины с целью снижения и/или предотвращения риска контаминации контрольных образцов в дальнейших исследованиях.

Контаминация биопроб может происходить на разных этапах: *in vivo* (контаминация организма животного) и *ex vivo* (на этапе забора биопроб, на преаналитическом и аналитическом этапах).

Характер обнаружения аналита в пробах не имел закономерности, характерной для животных, которым препарат был введен, концентрации аналита у животных контрольной группы были существенно ниже, чем у животных в экспериментальных группах (не более 10 % от средних значений, полученных на тех же временных точках для животных группы, получавшей минимальную дозу тестируемого препарата). Вышесказанное позволило сделать вывод, что контаминация проб не связана с ошибочным введением препарата животным контрольной группы.

Контаминация образцов может также происходить *ex vivo* — при их отборе, в процессе преана-

литического этапа (например, получения плазмы крови) и/или анализа проб. Изучив работу Zimmer [3], в которой даны рекомендации по предотвращению контаминации проб в биоаналитической лаборатории и в отношении биологической части исследования, мы проанализировали обстоятельства выполнения исследования 1 (на основании бесед с персоналом, анализа документов и записей по проведению исследования и т. д.). Было выяснено, что манипуляции с животными (введение препаратов и отбор образцов крови по временным точкам) сотрудники ветеринарной службы начинали с группы с наибольшей дозой тестируемого объекта (рис. 2А). Далее переходили к животным следующих групп в порядке снижения вводимой дозы препарата, манипуляции проводили в одном помещении, отбор образцов крови от животных разных групп в ряде случаев осуществлен одним лаборантом-исследователем, а смена средств индивидуальной защиты (СИЗ, в частности перчаток) происходила по необходимости. В такой ситуации нельзя исключить контаминацию образцов через остаточные количества крови, например, на перчатках, тампонах и других материалах, с которыми могли контактировать вакутейнеры для отбора крови и/или непосредственно отбираемый материал.

При получении плазмы крови (преаналитический этап) в химико-аналитической лаборатории были использованы одноразовые расходные материалы (пластиковые пробирки, наконечники для дозаторов), обработку проб проводили последовательно — по временным точкам согласно последовательности отбора образцов, а внутри каждой временной точки — от группы, не получавшей тестируемый объект, к группам, получавшим препарат в порядке увеличения дозы. После получения

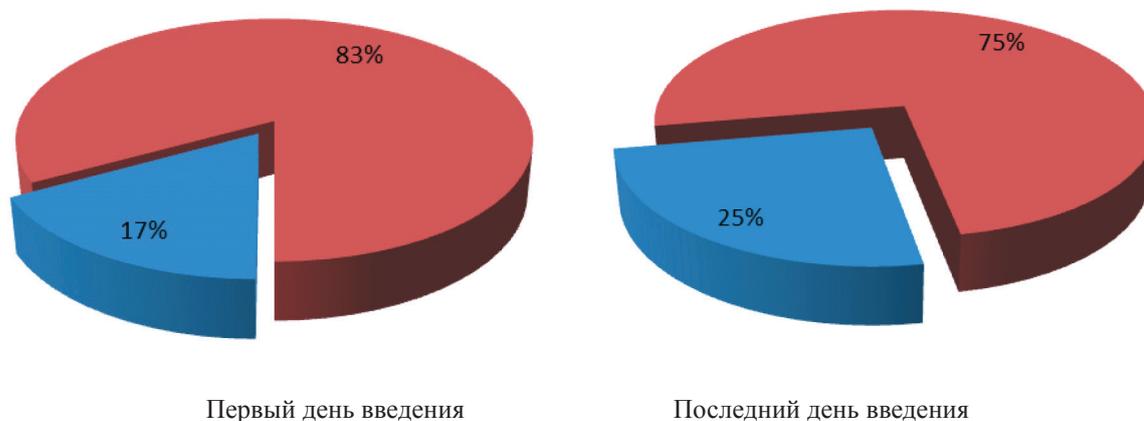


Рис. 1. Контаминация проб целевым аналитом в исследовании 1

Figure 1. Contamination of samples by targeted analysis in study 1

плазмы все образцы были расфасованы в пакеты (грипперы) по временным точкам и группам — для удобства дальнейшего анализа, снижения риска их перепутывания и контаминации. Такая организация работы предположительно должна способствовать минимизации вероятности контаминации образцов.

На аналитическом этапе работы с образцами также вели последовательно — по группам в порядке возрастания дозы препарата, внутри группы — по животным, у каждого животного — в порядке отбора временных точек. Все манипуляции также проводили с применением одноразовых расходных материалов (наконечников к дозаторам, пробирок, виал и т. п.), индивидуальных для каждой пробы каждого образца. Для исключения возможности загрязнения проб в процессе ВЭЖХ-МС/МС-анализа между группами проб от конкретных животных (от нулевой до последней временной точки) дополнительно в последовательность анализа были включены бланк-пробы (пробы интактного биоматериала, не содержащие целевой аналит). Отсутствие сигнала целевого аналита на хроматограммах дополнительных

бланк-проб, а также на хроматограммах проб, полученных до введения (нулевые точки), свидетельствовало об отсутствии переноса и контаминации проб в процессе анализа.

По результатам ретроспективного анализа остальных исследований токсикокинетики, выполненных в организации за 2022 год (табл. 3), было установлено, что в них манипуляции с животными начинали с группы, получавшей наименьшую дозу тестируемого объекта, и далее переходили к животным следующих групп в порядке увеличения вводимой дозы. Работы на преаналитическом и аналитическом этапах выполняли аналогично.

Таким образом, в ходе проведенного внутреннего расследования (на основании бесед с персоналом, анализа документов и записей по проведению исследования и т. д.) выяснено, что установить источник контаминации биопроб в процессе их получения и/или дальнейшей обработки затруднительно, однако, предположительно, контаминация происходила на этапе работы с животными (отбор биопроб). Уровень аналита, обнаруженный в образцах контрольной группы, был существенно ниже, чем уровень концентраций целевого аналита, обнаруживаемый

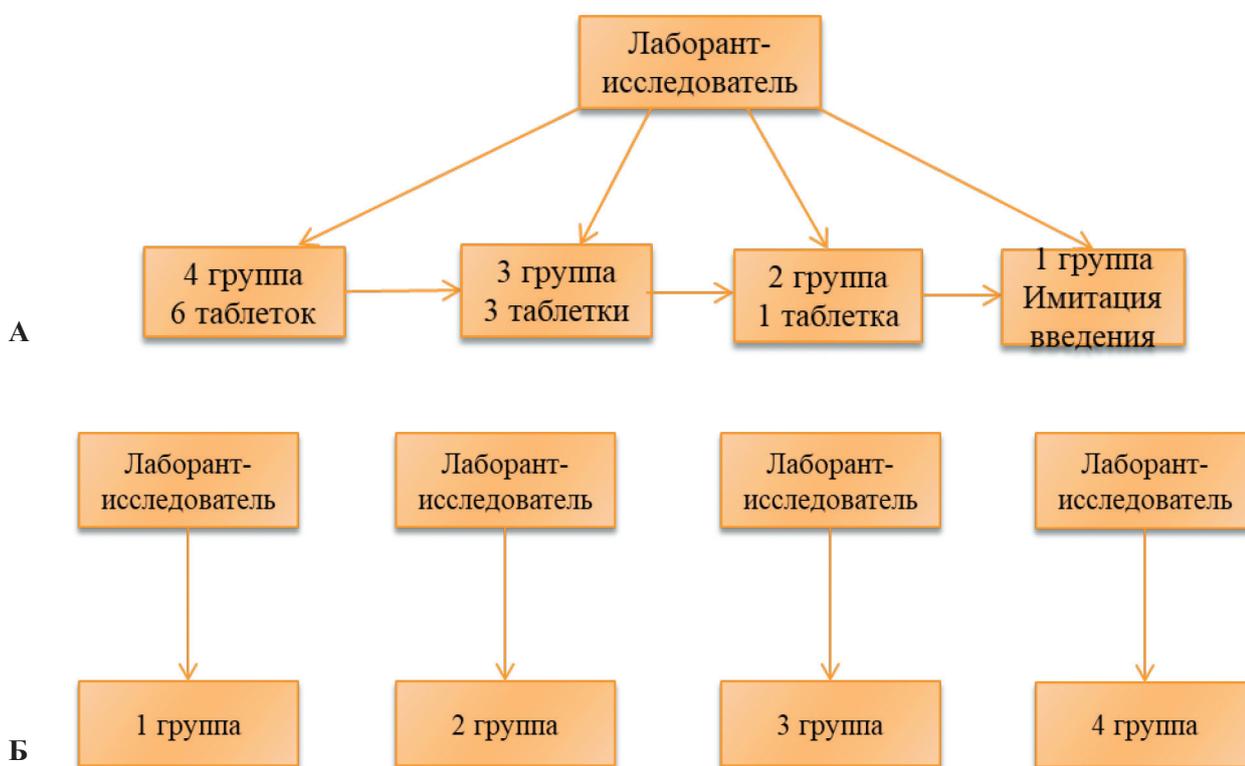


Рис. 2. Схема работы при отборе биоматериала в ходе биологической части исследования 1 (А) и исследования 2 (Б)

Figure 2. Scheme of work in the selection of biomaterial during the biological part of study 1 (A) and study 2 (B)

Таблица 3. Ретроспективный анализ исследований токсикокинетики, проведенных в организации в 2022 году*

Table 3. Retrospective analysis of toxicokinetic studies conducted in the organization in 2022*

Код исследования (протокол БЭК)	Животные, путь введения исследуемого объекта	Метод анализа	Наличие контаминации контрольной группы
3.72/20	Кролики, внутримышечно	ВЭЖХ-УФ**	Нет
1.32/21, 2.32/21	Кролики, перорально	ВЭЖХ-УФ**	Нет
1.41/21	Собаки, перорально	ВЭЖХ-УФ**	Нет
1.51/21	Крысы, внутрижелудочно	ВЭЖХ-МС/МС**	Нет, аналиты эндогенные
1.38/22	Яванские макаки, внутривенно	Мостиковый ИФА**	Да (0,8 % от количества образцов от животных контрольной группы)

Примечания: * — исследования, обсуждаемые в данной статье (БЭК 1.19/22 и 3.19/22 — исследование 1; 2.35/22 и 3.35/22 — исследование 2), не включены в таблицу; детальное изложение остальных исследований выходит за рамки обсуждаемой публикации, не имеет принципиального значения для предмета обсуждаемой работы, поэтому сведения о них (как и об исследуемых объектах и биоаналитических методиках, разработанных, валидированных и использованных во всех упоминаемых исследованиях), являющиеся конфиденциальной информацией, в статье не представлены;

** — ВЭЖХ-МС/МС — метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, ИФА — иммуноферментный анализ, ВЭЖХ-УФ — метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием.

Note: * — the studies discussed in this article (BEC 1.19/22 and 3.19/22 — study 1, 2.35/22 and 3.35/22 — study 2) are not included in the table; a detailed description of the remaining studies goes beyond the scope of the publication under discussion, is not of fundamental importance for the subject of the work under discussion, therefore information about them (as well as about the studied objects and bioanalytical techniques developed, validated and used in all mentioned studies), which are confidential information, are not presented in the article;

** — HPLC-MS/MS is a method of high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection, ELISA is enzyme immunoassay, HPLC is a UV method of high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection.

в экспериментальных пробах, что позволило исключить контаминацию *in vivo*. В целом, выявленный уровень контаминации экспериментальных проб признан незначительным и не оказавшим влияния на полноту получения и корректность интерпретации данных в этом исследовании.

В качестве корректирующих и профилактических мер, которые могут снизить или исключить контаминацию, предложены следующие:

1. Оптимизация организации работы лаборантов-исследователей, направленная на:

- исключение близкой по времени и месту выполнения работы одного сотрудника с животными, получающими разные дозы исследуемых объектов (рис. 2Б);

- регулярная смена СИЗ (прежде всего, перчаток), применение одноразовых расходных материалов (шприцы, дозаторы и иные устройства для

введения — в зависимости от пути введения исследуемых объектов; иглы, ватные/марлевые тампоны, и т. п., используемые при отборе биоматериала). По возможности, необходима смена на каждой временной точке для каждого животного.

2. Оптимизация преаналитического и аналитического этапов:

- последовательная работа с пробами от групп с меньшей дозой исследуемых объектов к группам с большей дозой;

- пробоподготовка и обработка проб в последовательности, соответствующей порядку (временной точке) отбора биоматериала;

- применение наконечников к механическим дозаторам, снабженных фильтром, препятствующим забросу пробы в дозатор;

- регулярная смена СИЗ (прежде всего, перчаток), применение одноразовых, индивидуальных

для каждой пробы расходных материалов (пробирки, виалы, наконечники для дозаторов и др.);

- регулярное техническое обслуживание, очистка используемого аналитического оборудования.

Эти рекомендации были зафиксированы в карте оценки риска, разработанной в организации, и применены при выполнении исследования 2. В этом случае аналит не был обнаружен ни в одной из проб, полученных от животных группы 1 в первый день введения, был обнаружен только в одной пробе — в последний день введения. Контаминация одной пробы свидетельствовала об отсутствии контаминации животных. Контаминация носила случайный характер, ее уровень (0,83 %) признан незначительным и не оказавшим влияния на полноту получения и корректность интерпретации результатов в данном исследовании. Полученные результаты свидетельствовали об эффективности предложенных мер профилактики, что позволило включить их во внутренние нормативные документы организации (соответствующие инструкции, СОП) и совершенствовать документы системы менеджмента качества, а также повышать качество выполняемых исследований.

Согласно⁶ значительная контаминация животных контрольной группы может ставить под сомнение валидность исследования, а также «приводить к аннулированию результатов исследований вследствие их низкого качества или недостаточности данных, позволяющих провести интерпретацию профиля безопасности исследуемого вещества и оценки риска его применения для человека». Какой уровень контаминации следует считать значительным, а каким можно пренебречь, является ли критичной только контаминация животных или контрольных образцов в целом, нормативным документом не оговорено. По мнению [3], уровень

неправильности (inaccuracy) результатов анализа экспериментальных значений концентраций аналогичен таковому для проб контроля качества (КК) и составляет 15 %. На этом основании автор считает, что, если завышение результатов для группы, получавшей минимальную дозу, в связи с контаминацией не более 15 %, то такие данные приемлемы для оценки токсикокинетики. Не ясно, какой процент контрольных образцов с концентрациями аналита выше НПКО может быть обнаружен и допустимы (или необходимы) ли какие-то закономерности обнаружения таких проб у одного или нескольких животных для соблюдения этого условия. В работе [4] высказано мнение, что контаминацию можно признать незначительной, если ее уровень не превышает 10 % в контрольных образцах или если обнаруженные концентрации ниже, чем для группы, получавшей наименьшую дозу тестируемого препарата. С нашей точки зрения, при наличии случайного характера загрязнений уровень контаминации (определяемый как число контрольных образцов с концентрацией аналита выше НПКО), не превышающий 25 %, можно считать приемлемым. В целом, при выполнении токсикокинетических исследований важно минимизировать или полностью исключить контаминацию исследуемым веществом животных контрольной группы и получаемых от них биопроб.

Отдельного обсуждения заслуживает неоднозначность трактовки регуляторных документов по вопросу анализа контрольных образцов — он может не требоваться⁷ или быть выполнен одновременно с анализом образцов из экспериментальных групп⁸. По данным [5], только около 67 % компаний отбирают контрольные образцы при проведении исследований и около 20 % из них в дальнейшем не анализируют эти образцы.

⁶ Рекомендации ЕАЭК № 10 от 21.05.2020 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения».

Guideline on evaluation of control samples in nonclinical safety studies: checking for contamination with the test substance. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), London, UK (2005). www.ema.europa.eu (21 May 2024).

⁷ Рекомендация ЕАЭК № 33 от 22.12.2020 «О Руководстве по изучению токсикокинетики и оценке системного воздействия в токсикологических исследованиях лекарственных препаратов».

⁸ Рекомендации ЕАЭК № 10 от 21.05.2020 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения».

Guideline on evaluation of control samples in nonclinical safety studies: checking for contamination with the test substance. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), London, UK (2005). www.ema.europa.eu (21 May 2024).

При описании результатов оценки токсичности и токсикокинетики некоторые авторы указывают на отсутствие контаминации по результатам анализа контрольных образцов [6], а в некоторых работах нет даже упоминания о том, что подобное было предусмотрено дизайном исследования [7]. Статья [8] вызвала активную дискуссию из-за высокого уровня концентраций эндогенного аналита (лантана), который, по мнению оппонентов [9, 10], мог быть обусловлен контаминацией контрольных образцов в процессе содержания животных и выполнения биологической части эксперимента, отбора биоматериала, его обработки и анализа. В ответ авторы обосновали корректность полученных данных и результатов исследования, однако, ситуация является примером значимости корректного исключения возможной контаминации для дальнейшей интерпретации результатов всей работы.

Исходя из нашего опыта токсикокинетических исследований, анализ контрольных образцов необходимо выполнять одновременно с экспериментальными образцами, так как, если контрольные образцы анализировать отдельно (позднее, для получения дополнительной информации при интерпретации результатов³), возникает вопрос их долгосрочной стабильности. Период, для которого долгосрочную стабильность образцов следует подтвердить в ходе валидации биоаналитической методики, должен превышать период хранения проб в конкретном исследовании⁹. С учетом того, что валидационные испытания должны быть завершены до начала анализа образцов, проверяемый период долгосрочной стабильности не может быть неопределенно длительным (в практической работе обычно составляет от 14–30 дней до 1–3 месяцев). В любом случае велика вероятность несоблюдения данного требования при отложенном анализе контрольных образцов, что в итоге может приводить к недостоверным или сомнительным результатам.

В одной из немногих публикаций, посвященных практическим аспектам обсуждаемой проблемы, авторы обобщили опыт, накопленный компанией Novartis (Швейцария-Франция), и поделились результатами исследования по моделированию контаминации в зависимости от условий содержания животных контрольных и экспериментальных групп (в разных помещениях или в одном помещении в отдалении или вблизи друг от друга) [4]. Авторы отметили, что в связи с выявленной контаминацией контрольных образцов по требованию регулятора ряд исследований был проведен повторно. Результаты новых исследований, отличавшиеся от первоначальных отсутствием контаминации, имели аналогичные основные заключения и выводы [4]. По мнению авторов, это свидетельствовало о том, что контаминация преимущественно происходит *ex vivo*.

На аналитическом этапе исследований большее внимание уделяют проверке и доказательству отсутствия «эффекта переноса» (carryover) при эксплуатации сложного аналитического оборудования (хроматографов, масс-спектрометров и т. п.) [5, 11–13]. Контаминацию (contamination) или загрязнение, по мнению авторов работы [5], можно разделить на три категории: контаминация аналитом до пробоподготовки (т. е. до отбора от субъекта и переноса в пробирку), контаминация аналитом во время пробоподготовки (экстракции, очистки, переноса в автосамплер и т. п.) и «контаминация» за счет присутствия/регистрации при анализе проб похожих на аналит соединений. При выявлении возможных причин загрязнения и для его профилактики необходимо уделять внимание чистоте атмосферы (воздуха) помещений, исключать ошибки во время отбора образцов, их обработки, хранения, пробоподготовки, источником загрязнений могут быть реагенты, внутренние стандарты, оборудование. Все перечисленные формы могут проявляться рандомно, без каких-либо закономерностей, что затрудняет их устранение [5].

⁹ Решение Совета ЕЭК № 85 «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского Экономического Союза» от 03.11.2016.

Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, 2018. 41 p.

Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2011. 22 p.

¹⁰ Guideline on evaluation of control samples in nonclinical safety studies: checking for contamination with the test substance. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), London, UK (2005). www.ema.europa.eu (21 May 2024).

Guidance Document for GLP inspectors and GLP test facilities Cross-contamination of control samples with test item in animal studies. European Commission. (Document date: 25/11/2004 — Publication date: 19/10/2015 <https://ec.europa.eu/docsroom/documents/13222>) (21 May 2024).

Наиболее поздняя публикация [3] представляет в большей степени взгляд на проблему со стороны регулятора и/или GLP (Good laboratory practice) инспектора. Автор отмечает, что процитированная выше работа [4] была первой и единственной статьей, в которой обозначалась проблема контаминации контрольных проб, обусловившая остановку регистрации ряда препаратов. Публикация и обсуждение этих результатов привели к появлению регуляторных документов¹⁰, посвященных необходимости оценки контаминации, и действиям по выявлению ее источников и предупреждению. Zimmer [3] рекомендует в биоаналитической лаборатории:

- применять тампонные тесты (смывы) на качество очистки помещения и оборудования;
- использовать одноразовые материалы везде, где возможно;
- применять СИЗ и их регулярно заменять (обязательно перед работой с контрольными образцами);
- при работе (взятии аликвоты) открывать сосуда с образцами по одному;
- обрабатывать контрольные пробы в первую очередь, до работы с экспериментальными пробами;
- включать дополнительные бланк-пробы при создании и выполнении аналитических серий, чтобы убедиться, что аналитическая система свободна от аналита к моменту начала анализа контрольных проб;
- проводить взятие навесок в весовой комнате, разделять ее с помещениями, где проводят «мокрую химию» (пробоподготовку) и расположено аналитическое оборудование.

Оптимально расположение аналитической лаборатории в отдельном здании и ее снабжение индивидуальной вентиляционной системой.

В отношении биологической части исследования [Zimmer, 2016] рекомендует:

- раздельное содержание (в разных помещениях) животных разных групп;
- отдельные приспособления, инструменты и рабочие площади для выполнения манипуляций с животными контрольной группы;
- регулярную уборку помещений и практику тампонных тестов (смывов) по ее результатам;
- регулярную смену СИЗ при работе с животными;
- выполнение манипуляций с животными контрольной группы до работы с животными из групп, которым осуществляют введение исследуемых объектов;
- привлечение разного персонала при работе с животными контрольной группы или обязатель-

ный душ и смена одежды между работой с животными из групп, которым осуществляют введение исследуемых объектов, и с животными контрольной группы.

Схожие рекомендации можно найти, например, в документе¹¹, в том числе довольно любопытную и разумную — уменьшить количество касаний, манипуляций с образцом и минимизировать число сотрудников, работающих с пробами. Отметим, что наши рекомендации, сформулированные по итогам оценки риска контаминации контрольных образцов, в целом соответствовали позициям литературных источников, которые в совокупности фиксируют вполне логичные и очевидные действия по профилактике контаминации контрольных образцов.

Заключение

Оценка контаминации контрольных образцов является необходимым элементом подтверждения корректности исследований токсикокинетики, сопутствующим изучению токсичности лекарственных веществ и препаратов. Вместе с тем недостаточная проработка действующих регуляторных документов обуславливает необходимость обсуждения практических аспектов и совершенствования регуляторной базы. На основании экспериментального опыта сформулированы рекомендации по минимизации и профилактике контаминации контрольных образцов при выполнении биологической части, преаналитического и аналитического этапов исследований. Предположительно, при наличии случайного характера загрязнений, свидетельствующего об их *ex vivo* происхождении, уровень контаминации (определяемый как число контрольных образцов с концентрацией аналита выше НПКО), не превышающий 25 %, можно считать незначительным, то есть не ведущим к дальнейшему отклонению и аннуляции результатов всего исследования.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Welling PG. Differences between pharmacokinetics and toxicokinetics. *Toxicol Pathol.* 1995;23(2):143–7. DOI: 10.1177/019262339502300207.
2. Pozharitskaya O, Shikov A, Makarov V. Toxicokinetics — Methodological Approaches. *Laboratory*

¹¹ How to Avoid Contamination in Lab Samples. <https://www.aurorabiomed.com/how-to-avoid-contamination-in-lab-samples/> (21 May 2024).

- Animals for Science. 2019;1. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-01-06> In Russian [Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н., Макаров В.Г. Токсикокинетика — методологические подходы. Обзорная статья. Лабораторные животные для научных исследований. 2019; 1]. DOI: 10.29296/2618723X-2019-01-06.
3. Zimmer D. Drugs in control samples in nonclinical safety studies: a reconsideration. *Bioanalysis*. 2016; (10):1003–7. DOI: 10.4155/bio-2016-0066.
 4. Nicholls I, Kolopp M, Pommier F, et al. The presence of drug in control samples during toxicokinetic investigations—a Novartis perspective. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2005;42(2):172–8. DOI: 10.1016/j.yrtph.2005.03.004.
 5. Hill HM, Smith GT. Evaluation and Elimination of Carryover and/or Contamination in LC-MS Bioanalysis., In: *Handbook of LC-MS Bioanalysis (Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations)*. Ed. by Li W, Zhang J, Tse F. 2013, 259–273. DOI: 10.1002/9781118671276.ch21.
 6. Maronpot RR, Ramot Y, Koyanagi M, et al. Ten-day and four-week toxicity and toxicokinetics studies of alpha-glycosyl isoquercitrin in juvenile Göttingen minipigs. *Toxicology Research and Application*. 2019;3. DOI: 10.1177/2397847319855087.
 7. Li Y, Liu TT, Jin HT, et al. A comparison of toxicity and toxicokinetics in rats and dogs following twenty-eight-day, repeat-dose oral administration of nifurtimox. *Toxicol Res (Camb)*. 2017;6(4):544–553. DOI: 10.1039/c7tx00061h.
 8. Lacour B, Lucas A, Auchère D, et al. Chronic renal failure is associated with increased tissue deposition of lanthanum after 28-day oral administration. *Kidney Int*. 2005;67(3):1062–9. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00171.x.
 9. McLeod C, Cox A, Bramall N. The need for contamination control in studies on lanthanum biodisposition. *Kidney Int*. 2005;68(6):2906. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00583_1.x.
 10. D’Haese PC, Behets GJ, De Broe ME, Damment SJ. Lanthanum pharmacokinetics: are rat data misleading? *Kidney Int*. 2005;68(6):2907–8. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00583_3.x.
 11. Hughes NC, Wong EY, Fan J, Bajaj N. Determination of carryover and contamination for mass spectrometry-based chromatographic assays. *AAPS J*. 2007;9(3):E353–60. DOI: 10.1208/aapsj0903042.
 12. Clouser-Roche A, Johnson K, Fast D, Tang D. Beyond pass/fail: a procedure for evaluating the effect of carryover in bioanalytical LC/MS/MS methods. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;47(1):146–55. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.12.019.
 13. Kim K, Lee H, Lee JJ, et al. Identification of a frit-related sample carryover in newborn screening by tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom Adv Clin Lab*. 2023;27:56–60. DOI: 10.1016/j.jmsacl.2023.01.001.
- Информация об авторах:**
 Косман Вера Михайловна, к.фарм.н., руководитель химико-аналитической лаборатории АО «НПО «Дом Фармации»;
 Карлина Марина Валерьевна, к.б.н., руководитель отдела технологии, кинетики и анализа лекарственных средств АО «НПО «Дом Фармации»;
 Петрова Елизавета Михайловна, младший научный сотрудник химико-аналитической лаборатории АО «НПО «Дом Фармации»;
 Макарова Марина Николаевна, д.м.н., директор АО «НПО «Дом Фармации»;
 Макаров Валерий Геннадиевич, д.м.н., профессор, научный руководитель АО «НПО «Дом Фармации».
- Authors information:**
 Vera M. Kosman, PhD, head of analytical laboratory, RMC “Home of Pharmacy”;
 Marina V. Karlina, PhD, head of department of technology, kinetics and analysis of drugs, RMC “Home of Pharmacy”;
 Elizaveta M. Petrova, junior researcher of analytical laboratory, RMC “Home of Pharmacy”;
 Marina N. Makarova, PhD, DSci (Medicine), director, RMC “Home of Pharmacy”;
 Valery G. Makarov, PhD, DSci (Medicine), Professor, scientific supervisor, RMC “Home of Pharmacy”.