

Организация фармакокинетических исследований

Мирошниченко И. И.¹, Кравцова О. Ю.²

¹ – ФГБНУ "Научный центр психического здоровья", Москва, Россия

² – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Аннотация. Статья посвящена различным аспектам организации исследований фармакокинетики лекарственных средств как на доклиническом, так и клиническом уровнях (изучение биоэквивалентности, терапевтический лекарственный мониторинг, оптимизация режимов дозирования), а также обустройству работы и оснащению (оборудование, химические реактивы, помещения, персонал) фармакокинетической лаборатории.

Ключевые слова: организация исследований; фармакокинетика; биоэквивалентность; терапевтический лекарственный мониторинг; фармакокинетическая лаборатория; методы исследования

Для цитирования:

Мирошниченко И. И., Кравцова О. Ю. Организация фармакокинетических исследований. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(3):12–19. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-3-12-19>

Поступила: 26 ноября 2021 г. **Принята:** 02 декабря 2021 г. **Опубликована:** 15 декабря 2021 г.

Organizing of pharmacokinetic investigations

Miroshnichenko II¹, Kravtsova OYu²

¹ – FSBSI "Mental Health Research Center", Moscow, Russia

² – FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The paper is devoted to various aspects of the organization of drug pharmacokinetics research both at the preclinical and clinical levels (bioequivalence study, therapeutic drug monitoring, optimization of dosage regimens), as well as the arrangement of work and equipment (instrumentation, chemicals, premises, personnels) of the pharmacokinetic laboratory.

Keywords: research organization; pharmacokinetics; bioequivalence; therapeutic drug monitoring; pharmacokinetic laboratory; research methods

For citations:

Miroshnichenko II, Kravtsova OYu. Organizing of pharmacokinetic investigations. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(3):12–19. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-3-12-19>

Received: November 26, 2021. **Accepted:** December 02, 2021. **Published:** December 15, 2021

Введение / Introduction

В настоящее время фармакокинетические исследования проводятся как для поиска среди веществ-кандидатов новых лекарственных соединений, так и для изучения свойств уже апробированных лекарственных средств (ЛС). Фармакокинетика (ФК) включает в себя классическую тетраду: процессы абсорбции, распределения, метаболизма и элиминации (АРМЭ). Зачастую фармакокинетические и токсикологические исследования проводятся одновременно (АРМЭТ).

К сожалению, вещество-кандидат с хорошей активностью *in vitro* не всегда проявляет активность *in vivo* [1]. Основные причины: токсичность, низкая биодоступность и неприемлемая длительность действия.

Причины «плохой» фармакокинетики:

- Плохая абсорбция при внесосудистом введении, в частности через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) (низкие значения концентрации препарата в крови);
- Плохая растворимость (трудности с внутрисосудистым введением, плохая абсорбция);
- Быстрый (пресистемный) метаболизм (низкие значения концентрации препарата в крови, короткий период полувыведения, высокий клиренс);
- Интенсивная билиарная экскреция (низкие значения концентрации препарата в крови, короткий период полувыведения, высокий клиренс);

- Высокая степень связывания с белками плазмы крови, связывание с эритроцитами, гидролиз ферментами плазмы крови (слабая эффективность);

- Ингибирование/активирование ферментов системы цитохрома P450 (межлекарственное взаимодействие);

- Плохая проникаемость из системного кровотока в ткани органов/органа-мишени, например, в мозг через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) (низкая эффективность или даже её отсутствие);

- Неудачная лекарственная форма (низкая относительная биодоступность в сравнении с субстанцией).

Всё это побуждает фармацевтические компании включать исследования ФК и метаболизма как часть скрининга веществ-кандидатов. Ввиду ограниченного времени на проведение исследования и наличия небольшого количества веществ-кандидатов изучение фармакокинетики проводится на 1–2 видах животных. Поэтому правильный выбор вида животных, проект будущего фармакокинетического исследования и разработка в сжатые сроки адекватного метода количественного определения вещества-кандидата становятся критическим пунктом в исследовании: перспективное соединение может быть отвергнуто из-за неправильного выбора объекта исследования, дизайна его проведения или плохого методического подхода.

После того, как вещество-кандидат отобрано для дальнейших исследований (в том числе и 1–2 фазы клинических исследований), регуляторные (контролирующие) инстанции требуют данные по метаболизму ЛС. Это особенно актуально в случае ЛС с активными метаболитами, механизм действия которых может отличаться от исходного вещества.

Задача клинической фармакокинетики — оптимизация терапии [2]. Исходя из вышесказанного, целью клинических фармакокинетических исследований является определение оптимальных режимов дозирования ЛС, оценка эффективности лекарственной терапии, выявление возможных неблагоприятных побочных реакций и терапевтический лекарственный мониторинг.

С методической точки зрения все ФК исследования можно условно разделить на 3 этапа [3]:

1. Препаративная часть.

1.1. Отбор биологического материала (включая дизайн проведения фармакокинетического эксперимента).

1.2. Предварительная обработка тест-ткани (получение сыворотки, плазмы, гомогенатов тканей).

1.3. Кодирование — система записи, обеспечивающая автоматизированную идентификацию готового продукта.

1.4. Транспортировка в аналитическую лабораторию.

1.5. Хранение до анализа.

2. Аналитическая часть.

2.1. Приготовление стандартных образцов исследуемых соединений.

2.2. Подготовка проб для анализа (осаждение белков; жидкостная, твердофазная экстракция).

2.3. Изучение связывания исследуемого соединения с белками плазмы/ сыворотки крови (метод равновесного диализа).

2.4. Инструментальный метод определения следовых количеств исследуемых соединений (иммуноанализ, ГЖХ, ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрия).

2.5. Построение калибровочных кривых, расчёт значений концентрации.

3. Фармакокинетическая часть.

3.1. Расчёт необходимых для определённого исследования фармакокинетических констант и параметров (расчёт ФК параметров с использованием физиологической, компартментной или некомпартментной моделей).

3.2. Подготовка соответствующего отчёта с учётом требований контролирующих инстанций и в ряде случаев заказчика.

Документация должна быть тщательно разработана, составлена, проверена, утверждена и распределена. Она должна отвечать соответствующим положениям производства и реализации готового продукта.

Вышеприведённая схема и обуславливает требования к структуре и оборудованию стандартной фармакокинетической лаборатории или, несколько

расширяя рамки объекта исследования, биоаналитической лаборатории. Желательно наличие аккредитации Росздравнадзора. При проведении экспериментов по международной тематике оборудование и штат должны соответствовать стандартам International Organization for Standardization ISO15189, касающихся деятельности медицинских лабораторий [4]. Россию в организации представляет Федеральное агентство по техническому регулированию (Росстандарт). Для соответствия этим стандартам необходимо, в первую очередь, соблюдение правил качественной лабораторной практики (GLP), а в той части лабораторной деятельности, которая относится к клинической ФК — надлежащей клинической лабораторной практики (GCLP) [5]. Правила надлежащей лабораторной практики (GLP) формально определяются как система качества, касающаяся организационного процесса и условий, в которых ФК исследования планируются, выполняются, контролируются и регистрируются, включая составление отчётов и их архивирование [6, 7].

Стандартные операционные процедуры (СОП) — инструкции для выполнения тех или иных действий, при анализе имеют решающее значение для эффективности и валидности биоаналитических исследований. Лаборатория должна иметь СОП для всех приборов, выполняемых операций и изучаемых веществ. Организация деятельности лаборатории по СОП обеспечивает согласованность работы, качество и целостность полученных данных. Текущие СОП должны находиться на «рабочем месте» и должны быть доступны для персонала, проводящего те или иные процедуры/операции [8].

Необходимо следовать стандартам, на основе которых осуществляется планирование, проведение лабораторных исследований и написание отчётов по их итогам [9]. Следование этим правилам обеспечивает достоверность данных и точную воспроизводимость эксперимента в будущем.

Лабораторные помещения должны обеспечивать адекватные условия для проведения экспериментов и исправного функционирования лабораторного оборудования.

Необходимо неукоснительное соблюдение инструкций к приборам, прилагаемых их изготовителем, а также тестирование оборудования, контрольные измерения, поддержание чистоты, надлежащее хранение реактивов и необходимый качественный ремонт измерительной техники.

Контроль качества экспериментов. Результаты измерений должны находиться в диапазоне, указанном изготовителем для того или иного прибора или лабораторной процедуры, и контроль качества эксперимента должен подтвердить, что эти пределы соблюдены. Результаты и дата контрольных измерений должны быть протоколированы в надлежащем виде.

Полученные результаты должны быть представлены в доступной для контроля форме и храниться в

надлежащем порядке. В случае клинических исследований, информация о пациенте (или добровольце) представляется в виде клинической карты и включает в себя: дату, ФИО (инициалы или иной шифр), наименование эксперимента и препарата и результаты измерений (значения концентрации в дискретные промежутки времени).

В ФК исследованиях применяются разнообразные аналитические методы. Среди них следует упомянуть микробиологические, иммунологические (RIA, ELISE), радиоизотопные методы, полярографию, капиллярный электрофорез. Тем не менее, наиболее распространённым методом остаётся высокоэффективная жидкостная и газовая хроматография. Хроматографические подходы позволяют проводить анализ следовых количеств многокомпонентных смесей с надлежащей избирательностью и чувствительностью [10]. Поэтому дальнейшее изложение в основном ориентировано на хроматографические методы, поскольку проведение иммунологических, радиоизотопных и микробиологических методов на наш взгляд является прерогативой специализированных лабораторий.

Надо признать, что последнее утверждение разделяется не всеми, в связи с введением в биоаналитическую практику метода флуоресцентного поляризационного иммуноанализа (FPIA). Интенсивность поляризованного флуоресцентного света измеряется с помощью автоматического анализатора фирмы Abbot Laboratories [11]. Бурно развивается и позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) — наиболее информативный метод визуализации для изучения распределения препарата в органах и тканях. Для реализации возможностей метода прежде всего необходимы радиотрейсеры, биологически активные соединения, содержащие в своём составе короткоживущие ПЭТ радиоизотопы (^{11}C , ^{18}F и др.) [12].

Методы изучения классической тетрады АРМЭ / Methods of studying the classical tetrad of ADME

Абсорбция/ Absorption (проницаемость):

IAM (immobilized artificial membrane — иммобилизованная искусственная мембрана) — это фосфолипиды, связанные со стационарной фазой ВЭЖХ. Время удерживания на такой хроматографической колонке позволяет предсказывать проницаемость ЛС через клеточные мембраны. Например, время удерживания на колонке IAM.PC.DD2 (Regis Technologies) позволяет оценить прохождение ЛС через ГЭБ [13].

PAMPA (Parallel artificial membrane permeability assay — параллельный анализ проницаемости искусственной мембраны) — модель исследования пассивной диффузии ЛС, представляет собой метод, который определяет проницаемость веществ из донорского отсека через искусственную мембрану с введением липидов в акцепторный отсек. В начале теста ЛС добавляется в донорский отсек, а акцепторный отсек не содержит

изучаемых веществ. После инкубационного периода, который может включать перемешивание, в каждом отсеке измеряют количество ЛС. Соотношение количества ЛС в отсеках позволяет оценить пассивную диффузию вещества через полупроницаемую мембрану (коммерческие наборы для проведения PAMPA: PAMPA Evolution™, PAMPA Explorer™ от pION Inc., AperW™ от Analiza Inc., MultiScreen PAMPA™ от Millipore) [13].

Модель клеточного монослоя / Cell Monolayer model — исследование пассивной диффузии, активного транспорта, эффлюкса (например, с гликопротеином Р) и пристеночного метаболизма, имеющего место в кишечнике. На линии клеток Caco-2 — карциномы толстой кишки человека, которые морфологически и функционально сходны с эпителием кишечника и применяются для оценки прохождения сквозь мембраны и абсорбции в ЖКТ. Инструменты и наборы для измерения прохождения через монослой клеток линии CaCo-2 широко представлены на рынке: Transwell™ (Corning), MultiScreen Caco-2™ (Millipore), BioCoat™ (BD Biosciences), Caco-2 Assay Kits (*In Vitro* Technologies).

Распределение / Distribution

В соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому исследованию ЛС, распределение изучают после однократного введения вещества лабораторным животным с последующим определением его в органах и тканях (различающихся по степени васкуляризации, в предполагаемых органах-мишенях, органах выделения) и расчётом коэффициентов распределения плазма крови /ткань [14].

Метаболизм / Metabolism

Изучение метаболизма *in vitro* проводят на модели различных фракций печени животных и человека (гепатоциты, S9 фракция, микросомы, супермикс — смесь изоферментов CYP, другие индивидуальные метаболические изоферменты). Фирмы поставщики этих фракций — BD Gentest, XenoTech, *In Vitro* Technologies, Invitrogen, Sigma-Aldrich, ADMET Technologies. S9 фракция печени содержит микросомы ретикулума и цитозоль клеток с основными ферментами как первой, так и второй фазы метаболизма, поэтому чаще всего используется при изучении биотрансформации ЛС.

In vivo поиск предполагаемых метаболитов осуществляют в биологических жидкостях (плазма крови, моча) животных после введения внутрь им исследуемого ЛС. В таких исследованиях (при наличии стандартных образцов метаболитов) для последних рассчитывают фармакокинетические параметры, в том числе и степень превращения ЛС в метаболиты.

Также изучают стабильность в плазме крови животных и человека.

Экскреция / Excretion — измерения содержания препарата в продуктах выделения (кал, моча).

Персонал / Staff

Лаборатория должна быть адекватно укомплектована квалифицированным персоналом. Обязанности сотрудников должны быть ясно сформулированы, и круг ответственности за ту или иную процедуру должен быть очерчен. Сюда можно отнести подготовку проб для анализа, работу на приборах и поддержка нормального функционирования оборудования, расчёт значений концентраций исследуемых веществ и фармакокинетических параметров, взаимодействие с клиницистами, заказ необходимых расходных средств и реактивов, поддержку чистоты лабораторной посуды и помещения, планирование эксперимента и подготовка отчётной документации. Следует признать необходимость того, что все сотрудники должны быть осведомлены о цели планируемых исследований и быть в курсе текущего положения дел [15].

На наш взгляд примерный состав подразделения может быть следующим:

- руководитель;
- лабораторный супервайзер с опытом проведения фармакокинетических исследований;
- технический супервайзер (инженер по оборудованию);
- специалист по GLP (QA);
- операторы на: хроматомакс-спектрометр (желательно две системы), ВЭЖХ, ГЖХ, автоматизированную систему обработки проб;
- специалист по рутинной пробоподготовке;
- 2 лаборанта;
- статистик.

Лабораторные помещения / Laboratory facilities

Рабочие помещения лаборатории должны иметь достаточно места, чтобы не создавать помех для работы или безопасности сотрудников. Температура и влажность лабораторного помещения должны поддерживаться в пределах допусков, установленных изготовителем оборудования. Возможность резких температурных перепадов и воздушных потоков в помещении, где находится высокочувствительное лабораторное оборудование, должна быть совершенно исключена. Все этажи, стены, потолки и столешницы лаборатории должны быть чистыми и ухоженными. Измерительные приборы должны иметь адекватное заземление. В том случае если тестируемые соединения и химические реактивы требуется хранить при низких плюсовых температурах, соответствующий холодильник должен поддерживать температуру 2–8 °С. Запрещается использовать этот холодильник для бытовых целей. Если при исследовании применяются биоактивные или представляющие опасность для здоровья материалы, они должны быть снабжены соответствующими этикетками. Следует контролировать температуру холодильника ежедневно, чтобы гарантировать со-

хранность реактивов. Если обслуживание прибора или СОП предусматривает использование дистиллированной или деионизированной воды, наличие адекватного источника обязательно.

В целом можно предусмотреть наличие следующих помещений для успешной деятельности лаборатории [3]:

1. Аналитическая комната.

Вытяжной шкаф здесь не предусматривается, но необходима проточная вентиляция и, возможно, кондиционер. При необходимости производственные помещения должны быть оборудованы системой кондиционирования приточного воздуха, которая должна:

- обеспечивать соответствующую степень очистки воздуха от механических частиц и микроорганизмов;
- автоматически регулировать климатические параметры (температуру и относительную влажность воздуха) для создания наиболее благоприятных условий для технологического процесса и обслуживающего персонала.

2. Помещение для подготовки проб к анализу.

Необходимо наличие 2 вытяжных шкафов, причём один с подведённой водой и мойкой: для фильтрации подвижной фазы и выпаривания проб.

3. Комната для хранения реактивов и поставляемых проб.

Должна быть оборудована средствами противопожарной безопасности.

4. Комната для обработки данных.

5. Помещение для персонала лаборатории.

Оборудование / Equipment

1. Препаративная часть:

- морозильная камера (–80 °С);
- холодильник (2–8 °С) с морозильной камерой (–20 °С);
- пробирки для получения плазмы/сыворотки крови;
- центрифуга (до 15 000 г) с холодильником и сменным ротором;
- полипропиленовые пробирки (контейнеры) для перевозки образцов;
- сосуды Дьюара (термосы) для перевозки образцов.

2. Аналитическая часть.

2.1. Приготовление стандартных образцов исследуемых соединений:

- аналитические весы (0,0001 г);
- автоматические пипетки, типа Eppendorf, Finpipette (20–100, 50–200, 200–1000, 1000–5000 мкл) и соответствующие наконечники к ним;
- шприцы Hamilton (25, 50, 100, 200 мкл);
- магнитная мешалка;
- химические бюксы, стаканы и пробирки для рабочих разведений;
- холодильник (2–8 °С) с морозильной камерой (–20 °С);

– спектрофотометр в UV-Vis диапазоне для снятия спектральных характеристик, в случае необходимости.

2.2. Подготовка проб для анализа

Жидкостная экстракция:

- аналитические весы (0,001 г);
- pH-метр;
- миксер типа Vortex;
- горизонтальный реципрокный встряхиватель;
- центрифуга (до 15000 г) с холодильником и сменным ротором;
- настольная центрифуга (bench type) до 8000 об/мин;
- водяная баня (термостат) с терморегулятором для выпаривания образцов в токе азота. Предпочтительно использование специальных устройств для выпаривания (к примеру, N-EVAP, Nitrogen Evaporator, производства фирмы Organomation Assoc; Shrewsbury, MA);
- азот в баллонах или в подведённой линии от генератора азота;
- соответствующие разного объёма химически инертные пробирки для культур и центрифужные пробирки с герметическими крышками и тефлоновой или политетрафлуорэтиленовой подкладкой.

– ультразвуковая баня.

Твёрдофазная экстракция:

- вакуумный насос;
- мембраны для твёрдофазной экстракции (например, Empore octyl solid-phase extraction membranes (Analytichem International, Harbor City, CA, U.S.A.);
- патроны для твёрдофазной экстракции (Sola columns (Thermo) или Oasis cartridges (Waters));
- Вакуумный манифолд (Vac-Elut vacuum manifold или Waters vacuum manifold);
- наиболее целесообразно (но дорого!) применение роботизированных систем пробоподготовки: Tekan, Hamilton Robotic instrumentation; Co-Sense for LC-MS (Shimadzu).

2.3. Равновесный диализ

Одним из процессов, рассматриваемых при изучении ФК лекарственных веществ, является связывание с белками плазмы крови (альбумин, α -1 кислый гликопротеин, β -глобулины). Для оценки связывания лекарственного вещества с белками плазмы крови традиционно применяется метод равновесного диализа. Этот метод также применяется для *in vitro* оценки прохождения ЛС через ГЭБ. Современным вариантом проведения метода равновесного диализа являются наборы: фирмы Pierce – Rapid Equilibrium Dialysis Device (RED) и фирмы HTDialysis, LLC – Reusable 96-well Micro-Equilibrium Dialysis Device HTD 96.

В качестве дополнительного оборудования помимо диализных наборов также требуется:

- планшетный термошейкер-инкубатор.
- миксер типа Vortex.
- промывалки.
- многоканальные пипетки 0,2–10 и 50–1200 мкл, соответствующие наконечники к ним.
- шкаф для хранения реактивов.

– металлический шкаф для хранения легковоспламеняющихся жидкостей (ЛВЖ).

2.4. Инструментальные методы определения

2.4.1. ИФА

Иммуноферментный анализ (ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) – рутинный иммунологический метод количественного определения как низкомолекулярных соединений, так и макромолекул, в основе которого лежит специфическая реакция антиген–антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. Метод ИФА обеспечивает простоту, чувствительность в диапазоне пикограммов, но, как и все методы, основанные на иммуноанализе, ограничен селективностью антитела [16]. Главными достоинствами методов ИФА и ВЭЖХ-МС-МС являются возможность автоматизации (ИФА) и быстрый переход с одного вида анализа на другой при ВЭЖХ-МС-МС. К числу недостатков следует отнести перекрестные реакции в ИФА, ионную супрессию и матричный эффект в ВЭЖХ-МС-МС [17].

2.4.2. Хроматография

Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ:

- деионизованная вода: система типа Milli-Q system/ Водoley;
- система для фильтрации фазы;
- фильтры (например, нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм; Rainin, США);
- система для дегазации фазы под вакуумом или в присутствии инертного газа;
- ультразвуковая баня;
- аналитические весы (0,0001 г);
- pH- метр.

LC-MS-MS

Можно констатировать, что в настоящее время наличие хромато-масс-спектрофотометрического оборудования является совершенно необходимым атрибутом успешной жизнедеятельности фармакокинетической лаборатории [18]. Причём наблюдается тенденция вытеснения сочленения масс-детекторов с газовыми хроматографами жидкостной хроматографией с тандемной детекцией. Детектор (масс-спектрометр) должен быть класса TQMS – трёхквadrupольный масс-спектрометр (triple quadrupole mass spectrometer) или Q-TOF – сочетание квадруполь с времяпролётным анализатором (quadrupole time-of-flight), или типа орбитальная ионная ловушка (orbitrap) [19]. Последние из упомянутых (Q-TOF, Orbitrap) являются масс-спектрометрами высокого разрешения и необходимы для расчёта точных масс ЛС и их структурных фрагментов, и тем самым позволяют повысить точность их идентификации. При наличии у ЛС метаболитов, близких по структуре, анализаторы высокого разрешения позволяют не прибегать к сложному и длительному по времени хроматографическому разделению этих метаболитов [20].

Детекторы

Основными производителями масс-спектрометров являются Sciex, Agilent, Thermo, Waters, Shimadzu. Список далеко не полный. Все они обладают вполне приемлемыми характеристиками и выбор, в значительной мере, носит произвольный характер.

Система ВЭЖХ для сочленения с масс-спектрометром

В настоящее время все вышеуказанные фирмы имеют и собственные разработки как жидкостных, так и газовых хроматографов.

ВЭЖХ

Автоматизированная градиентная система, включающая в себя:

- 2–3 насоса;
- смеситель низкого давления;
- вакуумный дегазатор in-line;
- термостат для колонки;
- термостатируемый автосамплер (с набором виал или плашечного формата);
- системный контролер;
- спектрофотометрический детектор в UV-Vis диапазоне, в качестве альтернативы детектор с диодной матрицей (DAD);
- флуориметрический детектор;
- электрохимический детектор.

3. Фармакокинетическая часть

3.1. Расчёт фармакокинетических параметров

Персональный компьютер с необходимой периферией (принтер, сканер) и с набором соответствующего программного обеспечения: WinNonlin, Kinetika – анализ ФК параметров при однократном и/или многократном введении, биоэквивалентность;

NONMEM, NPEM, MONOLIX – популяционный ФК анализ.

Химические реактивы

Reagents

Все реагенты и растворы в лабораторных помещениях должны быть маркированы с указанием идентичности, титра или концентрации, требований к хранению и срока годности. При хранении в одном шкафу целесообразно соблюдать «правило трёх полок: на верхней полке располагаются кислоты, на средней – соли и внизу – основания. Авторы прекрасно представляют себе условия закупки необходимых для проведения экспериментов реактивов. Тем не менее, следует избегать излишнего накопления запасов органических растворителей, как правило, представляющих собой ЛВЖ. Особые условия необходимо соблюдать при хранении метанола: металлический шкаф, ключ от которого хранится у уполномоченного лица (лаборанта).

Необходимо обеспечить правильное и безопасное хранение отходов производства, подлежащих уничтожению, и мусора. Их следует помещать в специальные промаркированные ёмкости. Токсические вещества и горючие материалы следует хранить в пригодных для этих целей, промаркированных, закрытых ёмкостях.

Ёмкости с отходами следует ежедневно выносить в специально отведённые места вне производственных зданий, а их содержимое следует регулярно вывозить на переработку или утилизацию.

Кислоты и основания: борная, муравьиная, хлористоводородная, перхлорная, ортофосфорная, серная, уксусная, трихлоруксусная, трифторуксусная кислоты, гидроксиды калия, натрия, аммония.

Растворители: ацетон, ацетонитрил, бензол, 1-бутанол, n-бутил хлорид, хлороформ, дихлорметан, дихлорметилсилан, диэтиловый эфир, диоксан, этанол (в том числе абсолютный), этиловый эфир уксусной кислоты, формальдегид, n-гексан, n-гептан, изоамиловый спирт, изопропиловый спирт, метанол, метил-трет-бутиловый эфир, n-пентан, 2-пропанол, тетрагидрофуран, толуол.

Особенности использования реактивов для ВЭЖХ-МС – приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ-МС имеет свои специфические черты, связанные с детекцией. Дело в том, что кроме общих для традиционной ВЭЖХ проблем, связанных с интерференцией съвороточных пиков, для масс-спектрометров наблюдается феномен значительного уменьшения величины хроматографического сигнала вследствие ионизации самой подвижной фазы. В связи с этим не используются многие широко распространённые подвижные фазы, в частности категорически противопоказано использование фосфатных буферов [21]. Фактическим стандартом для ВЭЖХ-МС являются градиентные смеси буфера ацетата/формиата аммония с органически модификатором (ацетонитрилом или метанолом). Мы рекомендуем по возможности использовать летучие смеси 0,1–0,2 % муравьиной кислоты и органического модификатора для лучшей работы. Необходимо избегать попадания нелетучих буферов в МС детектор, так как из-за этого внутри источника ионов – в транспортном капилляре и в отверстии для спрея – могут образовываться соли. Растворы летучих буферов, способствующих ионизации нейтральных молекул, могут включать в себя следующие вещества: уксусная кислота, аммония ацетат, аммония формиат, аммония гидроксид, триэтиламин, трифторуксусная кислота.

Соли: аммония ацетат, аммония бикарбонат, аммония фосфат, аммония сульфат, калия фосфат одно- и двухзамещённый, натрия фосфат одно- и двухзамещённый, натрия ацетат, натрия борат, натрия карбонат и бикарбонат, натрия хлорид, Na₂EDTA, натрия сульфат, Tris-HCl.

Ионопарные реагенты и модификаторы: диэтиламин, триэтиламин, натрия 1-октансульфонат, натрия додецилсульфат (SDS), гексадецилтриметиламмония бромид, тетрабутиламмония гидроксид, натрия 1-гептансульфонат. Следует констатировать, что анализ на ВЭЖХ-МС системе позволяет во многих случаях обходиться без трудоёмких процедур дериватизации исходного вещества [22].

Деятельность стандартной фармакокинетической лаборатории, устроенной и оснащённой по вышеописанной схеме, направлена на проведение следующих исследований:

- доклиническая (экспериментальная) фармакокинетика, неклиническая по терминологии зарубежных авторов;
- качественный и количественный анализ, в том числе и метаболизма ЛС;
- клиническая фармакокинетика;
- биоэквивалентность;
- терапевтический лекарственный мониторинг.

Необходимо подчеркнуть, что фармакокинетическая лаборатория выполняет, в основном сервисные функции [23]. В этом смысле она выполняет заказы от производителей лекарств и лечебных учреждений. Из этого вытекает, что подобные лаборатории являются, как правило, структурной частью фармацевтических фирм, крупных лечебных центров или государственных контролирующих организаций.

В чисто исследовательском плане деятельность фармакокинетической лаборатории включает в себя изучение клинической фармакокинетики, метаболизма ЛС [24]. Всё большую популярность приобретает популяционный метод: данные, полученные от большого числа пациентов, инкорпорируются в целостную выборку. Значения концентрации в дискретные интер-

валы времени у различных пациентов объединяются и подвергаются соответствующему программному анализу, хотя количество пробоотборов у отдельного индивидуума может быть равным единице [25].

В случае более широкого спектра исследований проводится анализ содержания эндогенных биологически активных веществ (биогенные амины, аминокислоты, простагландины, гормоны, витамины). Особую актуальность имеет измерение содержания в организме биомаркеров, которые представляют собой очень чувствительные и определённые индикаторы болезней [26]. Диагностические тесты на основе биомаркеров предполагается использовать для повышения точности диагностики, мониторинга прогрессирования заболевания, для определения вариантов лечения и ответа на терапию. Обнаружение и валидация таких молекул может стать основой для создания дополнительных параклинических методов диагностики заболеваний, либо поспособствовать созданию таргетных мишеней для индивидуализации фармакотерапии, что является одной из важных задач современной фундаментальной медицины.

С методической точки зрения одной из задач лаборатории является создание свода валидированных, качественных методик количественного определения лекарственных и иных, представляющих клинический интерес, средств.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мирошниченко Игорь Иванович

e-mail: igormir@psychiatry.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4950-5336>

SPIN-код: 4117-9703

д. м. н., заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ НЦПЗ, Москва, Россия

Miroshnichenko Igor I.

e-mail: igormir@psychiatry.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4950-5336>

SPIN code: 4117-9703

Dr. Sci. (Med.), Head of pharmacokinetics laboratory MHRC, Moscow, Russia

Кравцова Оксана Юрьевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: oukravtsova@yahoo.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0693-2007>

SPIN-код: 1733-2330

к. б. н., н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kravtsova Oxana Yu.

Corresponding author

e-mail: oukravtsova@yahoo.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0693-2007>

SPIN code: 1733-2330

PhD in Biology, Researcher scientist of pharmacokinetics laboratory FSBI «Zakusov institute of pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Guan L, Yang H, Cai Y, et al. ADMET-score – a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. *Medchemcomm*. 2018;10(1):148–157. DOI: 10.1039/c8md00472b.
2. Gabrielson J, Weiner D. Non-compartmental Analysis. *Methods Mol Biol*. 2012; 929:377–389. DOI: 10.1007/978-1-62703-050-2-16.
3. Мирошниченко И.И. Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств. – Москва: Медицинское информационное агентство; 2011. – 416 с. [Miroshnichenko II. Rational dosing and monitoring of medicines. Moscow: Medical Information Agency 2011. (In Russ).].
4. Schneider F, Maurer C, Friedberg RC. International Organization for Standardization (ISO) 15189. *Ann Lab Med*. 2017;37(5):365–370. DOI: 10.3343/alm.2017.37.5.365.
5. Ezzelle J, Rodriguez-Chavez IR, Darden JM et al. Guidelines on good clinical laboratory practice: Bridging operations between research and clinical research laboratories. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;46(1):18–29. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.10.010.
6. Ito K, Someya H. Good Laboratory Practice: Initial Development, Necessity, and Issues of Data Reliability in Basic Research. *Yakugaku Zasshi*. 2019;139(6):875–879. DOI: 10.1248/yakushi.18-00193-1.
7. Селезнева А.И., Смирнов В.А., Горячкин В.В., Чадова Н.Н., Поляков С.В., Шестаков В.Н., Абрамович Р.А. Интегрированная модель системы менеджмента качества лабораторных исследований лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(3):148–165. [Selezneva A.I, Smirnov VA, Goryachkin VV, Chadova NN, Polyakov SV, Shestakov VN, Abramovich RA. The integrated model of quality management system of laboratory studies of medicines. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(3):148–165. (In Russ).]. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-148-165.
8. Buonarati MH, Schoener D. Investigations beyond standard operating procedure on internal standard response. *Bioanalysis*. 2019;11(18):1669–1678. DOI: 10.4155/bio-2019-0187.
9. Summerfield S, Hayes R, Liang M et al. The business of bioanalysis: new technology integration into bioanalytical workflows. *Bioanalysis*. 2018;10(22):1775–1779. DOI: 10.4155/bio-2018-0269.
10. van Andel L, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH. Review of Chromatographic Bioanalytical Assays for the Quantitative Determination of Marine-Derived Drugs for Cancer Treatment. *Mar Drugs*. 2018;6(7):246. DOI: 10.3390/md16070246.
11. Glahn-Martínez B, Benito-Peña E, Salis F et al. Sensitive rapid fluorescence polarization immunoassay for free mycophenolic acid determination in human serum and plasma. *Anal. Chem*. 2018;90(8):5459–5465. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00780.
12. Weinstein EA, Liu L, Ordóñez AA et al. Noninvasive Determination of 2-[18F]-Fluoroisonicotinic Acid Hydrazide Pharmacokinetics by Positron Emission Tomography in Mycobacterium tuberculosis-Infected Mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(12):6284–6290. DOI:10.1128/AAC.01644-12.
13. Kerns EH and Di L. Drug-like properties: concepts, structure design, and methods: from ADME to toxicity optimization. – Academic Press (is an imprint of Elsevier); 2008.
14. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая./ Миронов А.Н. (гл. ред.) – М.: Гриф и К; 2013. – 944 с. [Rukovodstvo po provedeniiu doclinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. First part. Ed by Mironov AN. Moscow: Grif i K; 2013. (In Russ).].
15. Rosenthal WM. Establishing a pharmacy-based laboratory service. *J Am Pharm Assoc (Wash)*. Mar-Apr 2000;40(2):146–152, 154–156; quiz 321–323.
16. Konstantinou GN. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 2017;1592:79–94. DOI: 10.1007/978-1-4939-6925-8-7.
17. Brandhorst G, Oellerich M, Maine G et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry or automated immunoassays: what are the future trends in therapeutic drug monitoring? *Clin. Chem*. 2012;58(5):821–825. DOI: 10.1373/clinchem.2011.167189.
18. Мирошниченко И.И., Шилов Ю.Е. Анализ биологических образцов в современной лабораторной практике (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):115–120. [Miroshnichenko II, Shilov YE. Analysis of Biological Samples in a Contemporary Laboratory Practice (Review). *Drug development & registration*. 2019;8(2):115–120. (In Russ).]. DOI: 10.33380/23052066-2019-8-2-115-120.
19. Хохлов А.Л., Рыска М., Кукес В.Г. и др. Теоретические и практические основы проведения исследований воспроизведенных лекарственных препаратов. – Москва-Ярославль-Прага: ООО Фотолайф; 2017. – 227 с. [Hohlov AL, Ryska M, Kukes VG et al. Theoretical and practical bases of research of reproduced drugs. Moscow-Praga-Yaroslavl: Photolife LLC; 2017. (In Russ).].
20. Макаров А. Масс-спектрометры Thermo Fisher Scientific. ORBITRAP – 10 лет прогресса. *Аналитика*. 2016;5(30):22–37. [Makarov A. Mass spectrometers Thermo Fisher Scientific. ORBITRAP – 10 years of progress. *Analytics*. 2016;5(30):22–37. (In Russ).] URL: <https://www.j-analytics.ru/journal/article/5675>. Ссылка активна на: 04.11.2021
21. Tan A, Fanaras JC. Use of high-pH (basic/alkaline) mobile phases for LC-MS or LC-MS/MS bioanalysis. *Biomed Chromatogr*. 2019;33(1):e4409. DOI: 10.1002/bmc.4409.
22. Armstrong M, Jonscher K, Reisdorph NA. Analysis of 25 underivatized amino acids in human plasma using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2007;21(16):2717–2726. DOI: 10.1002/rcm.3124.
23. Жердев В.П., Литвин А.А. Роль и организация фармакокинетических исследований. *Клиническая фармакокинетика*. 2005;2(3):1–3. [Zherdev VP, Litvin AA. The role and organization of pharmacokinetic research. *Clinical pharmacokinetics*. 2005;2(3):1–3. (In Russ).].
24. Кукес В.Г. Клиническая фармакокинетика: теоретические, прикладные и политические аспекты. – М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009. – 432 с. [Kukes VG. Clinical pharmacokinetics: theoretical, applied and political aspects. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (In Russ).].
25. Sturkenboom MGG, Mårtson A-G, Svensson EM et al. Population Pharmacokinetics and Bayesian Dose Adjustment to Advance TDM of Anti-TB Drugs. *Clin Pharmacokinet*. 2021; 60(6):685–710. DOI: 10.1007/s40262-021-00997-0.
26. Capecchi R, Puxeddu I, Prates F, Migliorini P. New biomarkers in SLE: from bench to bedside. *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59(Suppl.5):v12–v18. DOI: 10.1093/rheumatology/keaa484.