

Volume 9, No. 4 2019

ISSN 1991-2919 (Print)
ISSN 2619-1172 (Online)

ВЕДОМОСТИ

**НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ
СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

**THE BULLETIN OF THE SCIENTIFIC CENTRE
FOR EXPERT EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS**

www.vedomostincesmp.ru

Том 9, № 4 2019

Архив журнала размещен в российских и международных реферативных и индексных базах данных: «Российский индекс цитирования» (РИНЦ), «КиберЛенинка», «Соционет», Российской государственной библиотеке, Академии Google (Google Scholar), BASE (Bielefeld Academic Search Engine), Dimensions, Open Archives Initiative, ResearchBib, WorldCat.

Пятилетний импакт-фактор РИНЦ — 0,403.

К публикации принимаются статьи, подготовленные в соответствии с правилами для авторов, размещенными на сайте журнала www.vedomostincesmp.ru.

Все статьи проходят рецензирование двумя рецензентами.
Используется модель двойного слепого рецензирования.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается.
Ускоренная публикация не допускается.

Материалы заочных конференций не публикуются.

ВЕДОМОСТИ
НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ
СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Рецензируемый научно-практический журнал

Выходит четыре раза в год

Основан в **2005** году

Главный редактор доктор медицинских наук Ю. В. Олефир

Москва

«Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения» — это рецензируемый научно-практический журнал, который ориентирован на разработчиков и производителей лекарственных средств, работников контрольно-разрешительной системы и государственного надзора в сфере обращения лекарственных средств, сотрудников научно-исследовательских институтов, преподавателей и студентов медицинских, фармацевтических вузов, врачей и провизоров.

К рассмотрению в журнале принимаются научные статьи, тематика которых соответствует следующим группам специальностей: 14.01.00 Клиническая медицина, 14.03.00 Медико-биологические науки, 14.04.00 Фармация.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, старший научный сотрудник,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Романов Борис Константинович, д-р мед. наук, доцент,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Агатонович-Куштрин Снежана, д-р фарм. наук, проф.,
Университет Ла Троба (Бендиго, Австралия)

Аляутдин Ренат Николаевич, д-р мед. наук, проф., ФГБУ
«НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Горячев Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук, ФГБУ
«НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Дурнев Андрей Дмитриевич, член-корр. РАН, д-р мед.
наук, проф., НИИ фармакологии им. В. В. Закусова
(Москва, Россия)

Иванов Максим Борисович, д-р мед. наук, Институт
токсикологии (Санкт-Петербург, Россия)

Киселева Нина Михайловна, д-р биол. наук, проф.,
РНИМУ им. Н.И. Пирогова (Москва, Россия)

Ковалева Елена Леонардовна, д-р фарм. наук, ФГБУ
«НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук, НПО
«ДОМ ФАРМАЦИИ» (Ленинградская область, Россия)

Ордабаева Сауле Кутымовна, д-р фарм. наук, проф.,
Южно-Казахстанская медицинская академия (Шым-
кент, Республика Казахстан)

Прокофьев Алексей Борисович, д-р мед. наук, проф.,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва,
Россия)

Прокофьева Вера Ивановна, д-р фарм. наук, проф., Пер-
вый МГМУ им. И. М. Сеченова (Москва, Россия)

Пятигорская Наталья Валерьевна, д-р фарм. наук,
проф., Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Москва,
Россия)

Саканян Елена Ивановна, д-р фарм. наук, проф.,
АО НПО «Микроген» (Москва, Россия)

Сюбаев Рашид Даутович, д-р мед. наук, ФГБУ
«НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Сычев Дмитрий Алексеевич, член-корр. РАН, д-р мед.
наук, проф., РМАНПО (Москва, Россия)

Титова Анна Васильевна, д-р фарм. наук, ФГБУ
«ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора (Москва, Россия)

Ягудина Роза Исмаиловна, д-р фарм. наук, проф., Пер-
вый МГМУ им. И. М. Сеченова (Москва, Россия)

Якушева Елена Николаевна, д-р мед. наук, проф., РязГМУ
(Рязань, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Алешкин Владимир Андрианович, д-р биол. наук, проф.,
МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (Москва, Россия)

Бобизода Гуломкоидер Мукамал, д-р биол. наук, д-р
фарм. наук, проф., ТГПУ им. С. Айни (Душанбе,
Республика Таджикистан)

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф.,
ФГБУ «ЦСП» Минздрава России (Москва, Россия)

Бунятян Наталья Дмитриевна, д-р фарм. наук, проф.,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва,
Россия)

Звартау Эдвин Эдуардович, д-р мед. наук, проф., Первый
СПбГМУ им. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия)

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф., ФГБУ
«НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Лепяхин Владимир Константинович, член-корр. РАН,
д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава
России (Москва, Россия)

Муляр Александр Георгиевич, д-р мед. наук, проф.,
МГМСУ им. А. И. Евдокимова (Москва, Россия)

Петров Владимир Иванович, академик РАН, д-р мед.
наук, проф., ВолгГМУ (Волгоград, Россия)

Хохлов Александр Леонидович, д-р мед. наук, проф.,
ЯГМУ (Ярославль, Россия)

Шимановский Николай Львович, член-корр. РАН,
д-р мед. наук, проф., РНИМУ им. Н. И. Пирогова
(Москва, Россия)

Яворский Александр Николаевич, д-р мед. наук, проф.,
ПушГЕНИ (Пушино, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ:

Корсун Лилия Владимировна, канд. биол. наук,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва,
Россия)

РЕДАКТОР:

Калиничев Сергей Анатольевич, канд. фарм. наук,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва,
Россия)

НАУЧНЫЕ РЕДАКТОРЫ:

Молчан Нина Валерьевна, канд. фарм. наук, ФГБУ
«НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Хрущева Мария Леонидовна, канд. хим. наук, ФГБУ
«НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКТОР ПЕРЕВОДА:

Губарева Ольга Николаевна, канд. филол. наук, ФГБУ
«НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

«The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» is a peer-reviewed scientific and practical journal which is primarily addressed to drug developers and manufacturers of medicines, control and licensing system officers, state regulators in the sphere of medicinal products circulation, staff members of scientific research institutes, lecturers and students of medicine and pharmacy faculties, doctors and pharmacists.

Articles submitted for publication in the journal should pertain to one of the following specialist fields: 14.01.00 Clinical Medicine, 14.03.00 Medico-Biological Sciences, 14.04.00 Pharmacy.

EDITOR-IN-CHIEF:

Yuri V. Olefir, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate,
Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF:

Boris K. Romanov, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof.,
Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD:

Snezana Agatonovic-Kustrin, Dr. Sci. (Pharm.), Prof.,
La Trobe University (Bendigo, Australia)

Renad N. Alyautdin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre
for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow,
Russia)

Dmitry V. Goryachev, Dr. Sci. (Med.), Scientific Centre for
Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Andrey D. Durnev, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.),
Prof., Zakusov Institute of Pharmacology (Moscow, Russia)

Maxim B. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Institute of Toxicology
(Saint Petersburg, Russia)

Nina M. Kiseleva, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Pirogov Russian
National Research Medical University (Moscow, Russia)

Elena L. Kovaleva, Dr. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for
Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.), Scientific-Production
Association «HOME OF PHARMACY» (Leningrad
Oblast, Russia)

Saule K. Ordabaeva, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., South Kaz-
akhstan Medical Academy (Shymkent, Republic of Kaz-
akhstan)

Alexey B. Prokofiev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre
for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vera I. Prokofieva, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Sechenov First
Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Natalia V. Pyatigorskaya, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Sechenov
First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Elena I. Sakanyan, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Scientific and
Production Association Microgen (Moscow, Russia)

Rashid D. Syubaev, Dr. Sci. (Med.), Scientific Centre for
Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Dmitry A. Sychev, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.),
Prof., Russian Medical Academy of Postgraduate Educa-
tion (Moscow, Russia)

Anna V. Titova, Dr. Sci. (Pharm.), Information and Metho-
dological Center for Expertise, Accounting and Analysis of
the Circulation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Roza I. Yagudina, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Sechenov First
Moscow State Medical University, Scientific Centre for Ex-
pert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Elena N. Yakusheva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Ryazan State
Medical University (Ryazan, Russia)

EDITORIAL COUNCIL:

Vladimir A. Aleshkin, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Gabrichevsky
Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbi-
ology (Moscow, Russia)

Gulomkodir M. Bobizoda, Dr. Sci. (Biol.), Dr. Sci. (Pharm.),
Prof., Ayni Tajik State Pedagogical University (Dushanbe,
Republic of Tajikistan)

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Centre for Strategic
Planning (Moscow, Russia)

Natalia D. Bunyatyan, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Scientific
Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Mos-
cow, Russia)

Edwin E. Zvartau, Dr. Sci. (Med.), Prof., Pavlov First Saint Pe-
tersburg State Medical University (Saint Petersburg, Russia)

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre
for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vladimir K. Lepakhin, Corr. Member of RAS, Dr. Sci.
(Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of
Medicinal Products (Moscow, Russia)

Alexander G. Mulyar, Dr. Sci. (Med.), Prof., Yevdokimov
Moscow State University of Medicine and Dentistry (Mos-
cow, Russia)

Vladimir I. Petrov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.),
Prof., Volgograd State Medical University (Volgograd, Russia)

Alexander L. Khokhlov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Yaroslavl
State Medical University (Yaroslavl, Russia)

Nikolay L. Shimanovsky, Corr. Member of RAS, Dr. Sci.
(Med.), Prof., Pirogov Russian National Research Medical
University (Moscow, Russia)

Alexander N. Yavorsky, Dr. Sci. (Med.), Prof., Pushchino
State Institute of Natural Sciences (Pushchino, Russia)

EXECUTIVE EDITOR:

Lilia V. Korsun, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre
for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow,
Russia)

EDITOR:

Sergey A. Kalinichev, Cand. Sci. (Pharm.), Scientific Cen-
tre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow,
Russia)

SCIENCE EDITORS:

Nina V. Molchan, Cand. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for
Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Maria L. Khrushcheva, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Centre
for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

TRANSLATION EDITOR:

Olga N. Gubareva, Cand. Sci. (Philology), Scientific Centre for
Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

ВЕДОМОСТИ НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

СОДЕРЖАНИЕ

Том 9, № 4 2019

ОБЗОРЫ

Г. Е. Кодина, А. О. Малышева

Основные проблемы обеспечения качества радиофармацевтических лекарственных препаратов 216

И. В. Лысикова, О. И. Басова

Регуляторные подходы к программе разработки лекарственных препаратов, применяемых для лечения инфекционных заболеваний 231

Н. Д. Бунятян, Б. Б. Сысуев, Л. Л. Николаева

Взаимозаменяемость препаратов на основе эссенциальных фосфолипидов 241

Г. Н. Енгальчева, Р. Д. Сюбаев, Д. В. Горячев

Стандарты качества доклинических фармакологических исследований 248

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

В. Г. Кукес, Ю. В. Олефир, Б. К. Романов, А. Б. Прокофьев, Е. В. Парфенова, М. А. Болдырева, О. А. Горошко, О. К. Парфенова, А. А. Газданова, Е. Ю. Демченкова

Механизм действия фоллистатин-подобного белка-1 (FSTL-1) 256

В. С. Кузьмин, В. В. Чернышев, А. И. Лутцева

Рентгенофазовый анализ кристаллических форм линезолида при контроле качества фармацевтической субстанции 261

Н. П. Антонова, Е. П. Шефер, А. М. Калинин, Н. Е. Семенова, С. С. Прохвятилова, И. М. Моргунов

Современные подходы к стандартизации настойки валерианы по показателю «Количественное определение» 265

МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

А. В. Сорокина, С. В. Алексеева, Н. В. Еремина, А. Д. Дурнев

Опыт проведения клинико-лабораторных исследований в доклинической оценке безопасности лекарств (часть 2: биохимические и патоморфологические исследования) 272

ИНФОРМАЦИЯ

II Международная научно-практическая конференция «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке» 280

Свидетельство о регистрации средства массовой информации: ПИ № ФС77-53169 от 14 марта 2013 г.

Учредитель: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес редакции: 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2

E-mail: vedomosti@expmed.ru

Тел.: +7 (495) 625-43-48, доб. 63-33, 63-34, 63-41

Сайт: www.vedomostincsmpr.ru

Издатель: ООО «НЭИКОН ИСП»

Юридический адрес: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5, офис 2.4

Тел./факс: +7 (499) 754-99-94

E-mail: isupport@neicon.ru

Сайт: https://neicon.ru/

Подписано в печать: 19.11.2019

Формат 60×90/8. Печ. л. 8,75

Бумага мелованная. Печать офсетная

VEDOMOSTI NAUCHNOGO TSENTRA EKSPERTIZY SREDSTV MEDITSINSKOGO PRIMENENIYA

[The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products]

CONTENTS

Volume 9, No. 4 2019

REVIEWS

- G. E. Kodina, A. O. Malysheva**
The Main Issues of Quality Assurance of Radiopharmaceuticals 216
- I. V. Lysikova, O. I. Basova**
Regulatory Approaches to the Development Programme for Medicines Used to Treat Infectious Diseases 231
- N. D. Bunyatyan, B. B. Sysuev, L. L. Nikolaeva**
Interchangeability of Essential Phospholipid Products 241
- G. N. Engalycheva, R. D. Syubaev, D. V. Goryachev**
Quality Standards of Preclinical Pharmacological Studies 248

ORIGINAL ARTICLES

- V. G. Kukes, Yu. V. Olefir, B. K. Romanov, A. B. Prokofiev, E. V. Parfenova, M. A. Boldyreva,
O. A. Goroshko, O. K. Parfenova, A. A. Gazdanova, E. Yu. Demchenkova**
The Mechanism of Action of Follistatin-like Protein-1 (FSTL-1) 256
- V. S. Kuzmin, V. V. Chernyshev, A. I. Luttseva**
X-ray Diffraction Analysis of Linezolid Crystalline Forms as Part of Quality Control of the Active Ingredient 261
- N. P. Antonova, E. P. Shefer, A. M. Kalinin, N. E. Semenova, S. S. Prokhvatilova, I. M. Morgunov**
Current Approaches to Valerian Tincture Standardisation in Terms of Assay 265

METHODICAL APPROACHES

- A. V. Sorokina, S. V. Alekseeva, N. V. Eremina, A. D. Durnev**
Summary of Clinical Laboratory Studies Performed During Preclinical Safety Evaluation
of Medicinal Products (Part II: Biochemical and Pathomorphological Studies) 272

INFORMATION

- 2nd International Scientific Conference «Pharmaceutical Development-2019» 280

Mass media registration certificate: PI No. FS77-53169 of March 14, 2013

Founder: Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation

Publisher: «NEICON ISP» LLC
Registered office: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow
115114, Russian Federation
Tel./fax: +7 (499) 754-99-94
E-mail: isupport@neicon.ru
Website: <https://neicon.ru/>

Postal address: 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051
E-mail: vedomosti@expmed.ru
Tel.: +7 (495) 625-43-48, ext. 63-33, 63-34, 63-41
Website: www.vedomostinccesmp.ru

Passed for printing: November 19, 2019
Format 60×90/8. Conventional printed sheets: 8,75
Enamel-paper. Offset printing

Основные проблемы обеспечения качества радиофармацевтических лекарственных препаратов

Г. Е. Кодина^{1,2,*}, А. О. Малышева¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский
биофизический центр имени А. И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства,
Живописная ул., д. 46, Москва, 123098, Российская Федерация

² Общество с ограниченной ответственностью «ДИАМЕД»,
Живописная ул., д. 46, Москва, 123098, Российская Федерация

Резюме. Одним из основных условий, определяющих успешное применение технологий ядерной медицины, является получение и введение пациенту радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) гарантированно высокого качества. Цель обзора — обсуждение специфических свойств РФЛП, обуславливающих специальные подходы к их производству (или изготовлению) и контролю качества. Определяющим требованием к обращению РФЛП на всех стадиях их жизненного цикла является соблюдение норм и правил радиационной безопасности. Рассмотрены основные подходы к оценке рисков медицинского облучения пациентов и радиационной защите персонала, работающего в области ядерной медицины. Выбор того или иного показателя качества и соответствующей аналитической методики должен определяться в соответствии со временем проведения анализа, которое так же, как и время синтеза, должно быть соизмеримо с периодом полураспада радионуклида, а также с возможностью реализации аналитического определения в условиях работы с высокоактивными образцами. С развитием тераностики в мировой практике вырабатываются новые подходы к регуляторным вопросам перехода от доклинических исследований радиофармпрепаратов к клиническим, поскольку, по мнению экспертов, это становится определяющим для быстрого внедрения достижений ядерной медицины. Результаты и выводы работы могут быть использованы при разработке и экспертизе фармакопейных статей и другой нормативной документации, сопровождающей обращение РФЛП. Проведенный анализ показал, что необходима разработка отдельных требований и руководств по испытаниям и экспертизе РФЛП для успешного продвижения их на рынок ЕАЭС.

Ключевые слова: радиофармацевтический лекарственный препарат; радиационная безопасность; радионуклид; фармакопей; производство/изготовление; ядерная аптека

Для цитирования: Кодина ГЕ, Малышева АО. Основные проблемы обеспечения качества радиофармацевтических лекарственных препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(4):216–230. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-216-230>

***Контактное лицо:** Кодина Галина Евгеньевна; gkodina@yandex.ru

The Main Issues of Quality Assurance of Radiopharmaceuticals

G. E. Kodina^{1,2,*}, A. O. Malysheva¹

¹ Russian State Research Center — Burnasyan Federal
Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency,
46 Zhivopisnaya St., Moscow 123098, Russian Federation

² DIAMED Ltd,
46 Zhivopisnaya St., Moscow 123098, Russian Federation

Abstract. One of the prerequisites for successful application of nuclear medicine technologies is the production and clinical use of radiopharmaceuticals (RPs) of a reliably high quality. The aim of the review is to discuss specific properties of RPs, which stipulate specific approaches to their production (or preparation) and quality control. The decisive requirement for the management of RPs at all stages of their life cycle is the observance of the radiation safety rules and regulations. The paper considers the main approaches to assessing the risks of medical radiation exposure to patients and radiation protection of nuclear medicine staff. The choice of a particular quality parameter and the corresponding analytical procedure should be made taking into account the duration of the test, which, like the production time, should be comparable with the radionuclide half-life. The feasibility of the analytical procedure should also be taken into account, given the high radioactivity of the samples tested. Now that theranostics has caught on, new approaches are being developed all over the world concerning regulatory aspects of transition from preclinical studies of RPs to clinical trials, because, according to experts, this is becoming a key condition for rapid implementation of nuclear medicine achievements. The results and conclusions of the present study can be used in the development and expert review of monographs and other specifications required for RP marketing and use. The results of the analysis suggest that it is necessary to develop specific requirements and guidelines for RP testing and evaluation for their successful promotion on the EAEC market.

Key words: radiopharmaceutical; radiation safety; radionuclide; pharmacopoeia; production/preparation; nuclear pharmacy

For citation: Kodina GE, Malysheva AO. The main issues of quality assurance of radiopharmaceuticals. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(4):216–230. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-216-230>

***Corresponding author:** Galina E. Kodina; gkodina@yandex.ru

Интенсивное развитие ядерной медицины в последнее десятилетие сопровождается развитием и внедрением в клиническую практику новых методов ранней диагностики, в первую очередь позитронной эмиссионной томографии, разработкой новых высокоспецифичных радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП, здесь и далее приведены термины и аббревиатуры из Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд.¹). Созданы и прочно вошли в мировую клиническую практику аппаратура мультимодальной визуализации нового поколения и таргетные РФЛП, позволяющие проводить оценку функционально-морфологического состояния органов на молекулярном уровне. По оценкам многих экспертов, в ближайшие годы ожидается широкое внедрение принципиально новых методов локального облучения патологических очагов, в первую очередь новообразований, с использованием ряда препаратов для радионуклидной терапии на основе альфа- и бета-излучающих радионуклидов. Сочетанное использование этих технологий позволяет добиться ощутимых результатов в плане повышения продолжительности жизни населения, а также значительно снизить финансовые затраты на лечение за счет повышения эффективности и сокращения сроков лечения. Одним из основных условий, определяющих успешное применение технологий ядерной медицины, является получение и использование в терапии радиофармацевтических лекарственных препаратов гарантированно высокого качества.

Цель работы — обсуждение специфических свойств радиофармацевтических лекарственных препаратов, обуславливающих специальные подходы к их производству (или изготовлению) и контролю качества. Результаты и выводы работы могут быть использованы при разработке и экспертизе фармакопейных статей и другой нормативной документации, сопровождающей обращение РФЛП.

ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

Считается, что «отцом» ядерной медицины стал Г. Хевеши, который в 1913 г. впервые применил метод радиоактивной индикации (метод «меченых атомов») с использованием природных изотопов. До открытия искусственной радиоактивности были известны радиоактивные изотопы лишь наиболее тяжелых элементов, поэтому их практическое использование было незначительным. Новый этап — развитие радиофармацевтики как одного из главных средств ядерной медицины — наступил с появлени-

ем ядерных реакторов, первоначально предназначенных для получения плутония в военных целях. На реакторе в Оак-Ридже (США) с конца 1940-х гг. был налажен синтез медицинских радионуклидов, прежде всего ³²P и ¹³¹I. В январе 1941 г. С. Герц приготовил первый лечебный препарат на основе ¹³¹I для пациента Массачусетского госпиталя, страдавшего диффузным токсическим зобом. В 1951 г. американское Управление по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) официально разрешило применение ¹³¹I у людей². Первые монографии на радиофармпрепараты были включены в XV издание Фармакопеи США (United States Pharmacopoeia, USP) в 1955 г. [1]. Однако собственно возникновение радиофармацевтики как самостоятельного специфического направления фармацевтики относятся к концу 1970-х гг. [2, 3].

В нашей стране первые фармакопейные статьи на радиофармацевтический препарат (РФП, тогда применялось наименование этой группы лекарственных средств, не содержащее слова «лекарственный», и соответствующая аббревиатура) были разработаны и опубликованы в 1968 г.³ До конца 1990-х гг. все вопросы экспертизы и рекомендаций для получения разрешений на клинические испытания (в терминологии тех лет) или клиническое применение решались на уровне специализированных комиссий по РФП Фармакопейного и Фармакологического комитетов Министерства здравоохранения СССР (эти комитеты существовали вплоть до образования в 2004 г. Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации). В состав комиссий входили признанные авторитетные ученые в области ядерной медицины, имеющие многолетний опыт ежедневной работы с РФП, поэтому решения принимались в кратчайшие сроки. Как правило, период времени от представления документации по доклиническим испытаниям РФП до получения разрешения на клинические испытания составлял не более 1 месяца, а затем в течение не более 1 года публиковался Приказ Министерства здравоохранения о разрешении на клиническое применение (равноценно современной государственной регистрации). Длительность клинических испытаний составляла 3–6 месяцев (30–50 пациентов в 2–3 медицинских организациях). Для воспроизведенных препаратов считалось возможным по результатам доклинических испытаний рекомендовать клиническое применение.

¹ ОФС.1.11.0001.15. Радиофармацевтические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.: 2018.

² Уйба ВВ, ред. *Ядерная медицина. Справочник для персонала отделений, лабораторий и центров ядерной медицины*. М: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России; 2019.

³ Государственная фармакопея СССР. X изд. М.: Медицина; 1968. Фармакопейные статьи:

622. Раствор натрия хромата, меченного хромом-51, для инъекций;

623. Раствор натрия фосфата, меченного фосфором-32, для инъекций;

624. Раствор натрия о-йодгиппурата, меченного йодом-131, для инъекций.

Описанный порядок позволил к середине 1980-х гг. разработать и внедрить в производство, то есть сделать доступными для пациентов, полный перечень РФЛП, имеющихся в распоряжении медицинских организаций развитых стран мира. Большинство технологий являлись оригинальными и были предложены по лицензиям в развивающиеся страны. Следует с сожалением отметить, что позже, в условиях регулярно меняющихся требований к документации и организации производства лекарственных средств (ЛС), быстрое внедрение в клиническую практику новых РФЛП стало в России практически невозможным. Дело в том, что не все современные требования, предъявляемые к производству и доклиническим и клиническим исследованиям ЛС, обоснованы и реально выполнимы для РФЛП. А объем их производства не может обеспечить возможность полноценного финансирования всех требуемых исследований.

ОТЛИЧИЯ РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ОТ ДРУГИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Любой РФЛП содержит один или несколько радионуклидов в определенной химической форме и является открытым источником ионизирующего излучения (ИИИ). Поэтому определяющим требованием к обращению РФЛП на всех стадиях их жизненного цикла является соблюдение норм и правил радиационной безопасности.

В РФЛП вещество, выполняющее роль активной фармацевтической субстанции (действующего вещества), находится, как правило, в микроконцентрации (на уровне 10^{-6} – 10^{-9} моль/л) и не может быть выделено и охарактеризовано в соответствии с требованиями к фармацевтическим субстанциям для других ЛС⁴.

Назначение РФЛП (для диагностики или лечения) определяют ядерно-физические характеристики радионуклида в составе препарата. Гамма- и позитрон-излучающие радионуклиды являются основой для РФЛП, используемых в процедурах радионуклидной диагностики, планарной или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ), позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ) и некоторых диагностических радионуклидных исследованиях, не связанных с визуализацией. В радионуклидной терапии применяются радионуклиды, распад которых сопровождается образованием корпускулярного альфа- или электронного излучения.

Выбор того или иного показателя качества и соответствующей аналитической методики должен определяться в зависимости от времени проведения анализа (которое должно быть, так же, как и время синтеза, соизмеримо с периодом полу-

распада радионуклида), а также возможности реализации аналитического определения в условиях работы с высокорadioактивными образцами в специальном оборудовании.

Основными показателями качества РФЛП, с точки зрения эффективности его применения, являются подлинность по радионуклиду, активность (общая или удельная, объемная, молярная), радионуклидная и радиохимическая чистота.

Доза РФЛП, назначаемая пациенту, измеряется в единицах радиоактивности (мегабеккерель, МБк) и рассчитывается на определенное время введения в соответствии с периодом полураспада радионуклида и физиологическими характеристиками пациента (индекс массы, поверхность тела и др. [4]). Серия РФЛП, выпускаемая производством, может содержать различные дозировки по активности, а их общее количество составляет несколько единиц. С развитием принципов персонализированной медицины некоторые РФЛП терапевтического назначения будут дозироваться с учетом времени введения конкретному пациенту. В отличие от других лекарственных средств большинство РФЛП применяется, как правило, однократно. Повторное применение возможно через несколько недель или месяцев.

Поступление РФЛП в свободную продажу исключено. Для поставки любого радиоактивного препарата или изделия в медицинскую организацию необходимо наличие лицензии на право обращения с ИИИ и санитарно-эпидемиологического заключения о возможности применения конкретных радионуклидных источников в отделении радионуклидной диагностики или терапии. Таким образом, передозировка или неправильное применение РФЛП возможны только в результате поставки некачественного препарата или ошибки персонала медицинской организации.

Срок годности (стабильность) РФЛП зависит от периода полураспада радионуклида и стабильности показателей качества препарата в условиях радиационного воздействия излучения. Упаковка, маркировка и условия хранения РФЛП определяются требованиями радиационной безопасности с соблюдением других необходимых условий. Некоторые перечисленные особенности РФЛП будут рассмотрены ниже более подробно с точки зрения обеспечения качества при их медицинском применении.

ПРОБЛЕМЫ РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ОБРАЩЕНИИ РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Радиационная безопасность персонала, населения и окружающей среды считается обеспеченной, если соблюдаются следующие принципы:

⁴ ОФС.1.1.0006.15. Фармацевтические субстанции. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

нормирование, обоснование, оптимизация и выполняются требования радиационной защиты. Эти требования установлены соответствующими законодательными актами в каждой стране, в том числе и в Российской Федерации⁵ с учетом рекомендаций Международной комиссии по радиологической защите⁶ и Международного агентства по атомной энергии (МАГАТЭ)⁷.

Принцип нормирования — непревышение допустимых пределов индивидуальных доз облучения граждан от всех источников излучения. Устанавливаются две категории облучаемых лиц: персонал (группы А и Б в зависимости от допустимых пределов доз) и все население, включая лиц из персонала вне сферы и условий их профессиональной деятельности. Для категории облучаемых лиц устанавливаются основные пределы доз (ПД) и производные от основных пределов доз, пределы годового поступления (ППП) и другие.

Принцип обоснования — запрещение всех видов деятельности по использованию источников излучения (ИИ), при реализации которых польза не превышает риска возможного вреда, причиненного дополнительным облучением. Принцип обоснования применяется на стадии проектирования радиационных объектов, новых источников излучения и при изменении условий их эксплуатации. При планировании и выполнении любой диагностической и терапевтической радиологической процедуры приоритеты выстраиваются так, чтобы получить максимальный медицинский эффект при минимально возможной лучевой нагрузке на пациента.

Принцип оптимизации предусматривает поддержание на возможно низком и достижимом уровне доз облучения персонала и пациентов. Дозы, получаемые пациентом при медицинском облучении, не нормируются, но применяются принципы обоснования назначения медицинских процедур и оптимизации защиты пациентов.

В нашей стране основные направления обеспечения радиационной безопасности в медицине изложены в положениях «Основ государственной политики в области обеспечения ядерной и радиационной безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу», утвержденных Указом Президента Российской Федерации от 13 октября 2018 г. № 585.

МЕДИЦИНСКОЕ ОБЛУЧЕНИЕ ПАЦИЕНТОВ

В программе доклинического исследования любого РФЛП обязательно выполняются прогностические оценки поглощенных доз излучения в определенных органах и эффективной дозы облучения человека по данным усредненных значений интегральных активностей в органах на единицу введенной активности животным. Значения интегральных активностей получают по результатам изучения фармакокинетики РФЛП методами прямой радиометрии органов и тканей и/или томографии (если возможно использование специальных ОФЭКТ-или ПЭТ-систем для животных, совмещенных с рентгеновским компьютерным томографом) с последующей математической обработкой с применением программного аппарата MIRD-формализма. Полученные результаты уточняются в период клинического исследования и обязательно вносятся в Инструкцию по медицинскому применению препарата. Для воспроизведенных РФЛП дозы облучения пациентов могут быть заимствованы из литературы. Международная комиссия по радиологической защите регулярно публикует усредненные сведения по дозам, полученные в результате исследований, проведенных в нескольких организациях разных стран по препаратам-аналогам⁸.

Подробный анализ современной структуры лучевой диагностики в Российской Федерации и зарубежных странах с определением трендов развития и внедрения технологий и методов лучевой диагностики и оценкой уровней медицинского облучения как на текущий момент, так и в перспективе, представлен в обзорной публикации [5]. В среднем коллективная доза от медицинского облучения в странах Европы на 80 % формируется за счет компьютерной томографии и около 10 % — за счет радионуклидной диагностики; средние эффективные дозы за рентгенорадиологическое исследование в Европе в 2–3 раза выше среднероссийских. Это не является каким-то достоинством нашей медицины, поскольку в России значительно ниже уровень применения лучевых технологий. В дальнейшем прогнозируется рост количества проведенных исследований методом компьютерной томографии, интервенционных и радионуклидных исследований и, как следствие, двойное повышение коллективной дозы от медицинского облучения.

⁵ Федеральный закон Российской Федерации от 9 января 1996 г. № 3-ФЗ «О радиационной безопасности населения»;

Федеральный закон Российской Федерации от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»;

Санитарные правила и нормативы СанПиН 2.6.1.2523-09 «Нормы радиационной безопасности НРБ-99/2009»;

Санитарные правила и нормативы СП 2.6.1.2612-10 «Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности (ОСПОРБ 99/2010)».

⁶ ICRP, 2007a. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103, Ann. ICRP 37 (2–4).

ICRP, 2015a. Radiation dose to patients from radiopharmaceuticals: A Compendium of current information related to frequently used substances. ICRP Publication 128, Ann. ICRP 44 (2S).

⁷ IAEA, 2005a. Applying radiation safety standards in nuclear medicine. Safety Reports Series No. 40, IAEA, Vienna, Austria.

⁸ ICRP, 2015b. Occupational intakes of radionuclides. Part 1. ICRP Publication 130. Ann. ICRP 44 (2).

Таблица 1. Прогностическая оценка рисков возникновения радиационно-индуцированного рака в зависимости от возраста мужчин в результате процедур ядерной медицины (по данным [8])**Table 1.** Predictive assessment of risks of radiation-induced cancer associated with nuclear medicine procedures for male patients, depending on their age (based on data presented in [8])

Радиофармпрепарат Radiopharmaceutical	Возраст пациента, лет Patient age, years			
	5	25	50	75
¹⁸ F] фтордезоксиглюкоза [¹⁸ F] fludeoxyglucose	0,0021	0,0010	0,0008	0,0003
^{99m} Tc-фосфонат ^{99m} Tc-phosphonate	0,00059	0,00034	0,00027	0,00013
¹³¹ I [3,7 ГБк (GBq)]	Не применяется Not applicable	0,041	0,029	0,012
²²³ Ra [21,9 МБк (MBq)]		0,31	0,21	0,09

В опубликованном исследовании проведен анализ отечественных и зарубежных подходов к оценке рисков от медицинского облучения для взрослых пациентов и детей с целью недопущения необоснованного облучения [6]. Показано, что данные исследования относятся к категориям «низкого» и «умеренного» радиационного риска. По итогам сравнения отечественной и зарубежных практик радиационной защиты в медицине предложены основные направления совершенствования системы радиационной защиты пациентов и персонала. Предлагается разработать комплексную программу по оптимизации радиационной защиты при использовании ИИИ в медицинских целях.

В обзоре отмечается, что до настоящего времени не существует единого подхода в оценке радиационных рисков медицинского облучения пациентов, но этой проблеме уделяется все больше внимания [7]. Наибольший вклад в годовую эффективную дозу от всех медицинских процедур вносит компьютерная томография (КТ): средняя накопленная доза пациента составляет 19,4 мЗв. Величина пожизненного атрибутивного риска заболеть раком на протяжении всей жизни (Lifetime Attributable Risk, LAR) — 0,14 %, риски более 1 %, как правило, имеют пациенты при многократном КТ-сканировании. В гибридном ПЭТ/КТ исследовании установление точной локализации патологического очага возможно при меньшем количестве сканов за одно исследование, то есть будет получена меньшая доза по сравнению с обычной КТ. Тем не менее любое радиологическое исследование связано с получением пусть небольшой (диапазон умеренного или низкого риска), но вполне измеримой дозы облучения. Согласно международным нормам безопасности пациент должен быть проинформирован о возможных неблагоприятных последствиях радиологической процедуры и рисках, с ней связанных. Роспотребнадзор для оценки радиационного риска у пациентов при проведении рентгенорадиологиче-

ских исследований рекомендует руководствоваться Методическими рекомендациями⁹.

В специальном исследовании [8], целью которого являлась прогностическая оценка риска развития рака на протяжении всей жизни (LAR) у пациентов разного пола и возраста, проходящих радионуклидную диагностику или терапию (табл. 1), показано, что уровень рисков в диагностических радионуклидных исследованиях на 1–3 порядка ниже по сравнению с КТ.

Вместе с тем на основании этих данных очевидна важность правильного выбора назначаемой процедуры. Например, не во всех случаях стоит (особенно многократно) назначать дорогостоящее ПЭТ-исследование, когда вполне достаточно проведения сцинтиграфии с препаратом ^{99m}Tc. Еще более актуален выбор конкретного препарата для конкретного пациента в радионуклидной терапии. Отдельно хотелось бы отметить, что неправильное применение или применение некачественного препарата связано с необоснованным получением пациентом дополнительных лучевых нагрузок. Но и необоснованный отказ от необходимого метода диагностики или лечения может нанести значительный ущерб пациенту или стоить жизни. Разработка общепринятых методов оценки индивидуального риска облучения и оценки соотношения польза/вред для обоснования применения каждого РФЛП в конкретных стандартах диагностики и лечения является одной из ключевых задач на ближайшие годы.

РАДИАЦИОННАЯ ЗАЩИТА ПЕРСОНАЛА

В организации радиационной безопасности персонала, работающего с ИИИ, в том числе и в области радиофармацевтики, обязательным является соблюдение принципа нормирования. Основные пределы доз облучения персонала, работающего с открытыми ИИИ, установлены в нашей стране в СанПиН 2.6.1.2523-09 «Нормы радиационной безопасности НРБ-99/2009».

⁹ Методические рекомендации «Оценка радиационного риска у пациентов при проведении рентгенорадиологических исследований». МР 2.6.1.0098-15. М.; 2015.

К работе с радионуклидными источниками допускаются лица не моложе 18 лет, не имеющие медицинских противопоказаний, прошедшие инструктаж и проверку знаний по обеспечению радиационной безопасности, по технологиям проводимых работ и по должностной инструкции (женщины освобождаются от работы с ИИИ на весь период беременности и грудного вскармливания ребенка). Администрация учреждения обязана планировать, организовывать и проводить мероприятия по обеспечению радиационной безопасности персонала. Доступ в помещения с ИИИ всех лиц, не участвующих в работе, запрещен.

Базовыми факторами снижения уровней внешнего и внутреннего профессионального облучения являются:

время — ограничение пребывания персонала под действием излучения обеспечивает снижение полученной дозы, то есть следует по возможности сокращать продолжительность пребывания персонала в радиационном поле радионуклидных источников;

расстояние — интенсивность воздействия излучения обратно пропорциональна квадрату расстояния от источника, поэтому необходимо увеличивать расстояние между источником и сотрудниками, по возможности использовать устройства дистанционного обращения с радиоактивными материалами и снижать активность радионуклидных источников, в радиационном поле которых находятся работающие с ними;

физическая защита — при работе с радионуклидными источниками, в том числе и с пациентами, которым введены РФЛП, необходимо использовать стационарные средства радиационной защиты, в том числе строительные конструкции, сборные стенки из свинцовых блоков, защитные сейфы, экраны, контейнеры, вытяжные шкафы, боксы.

С целью предотвращения возможной инкорпорации радионуклидов и тем самым снижения уровня внутреннего облучения персонала необходимо проводить все манипуляции с исходными радиоактивными материалами, РФЛП, наборами и радиоактивными отходами, а также осуществлять ликвидацию последствий радиационных аварий только с использованием комплекта средств индивидуальной защиты. По возможности использовать одноразовые средства индивидуальной защиты с их последующим удалением (твердые низкоактивные отходы).

РАДИОНУКЛИД — АКТИВНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ СУБСТАНЦИЯ

Определения понятия «Фармацевтическая субстанция (Активная фармацевтическая субстанция, АФС)», представленные в различных источниках информации, несколько различаются, но все они подразумевают возможность выделения фармацевтической субстанции в виде вещества (или смеси веществ), имеющего определенное агрегатное состояние, цвет (или его отсутствие) и другие характеристики¹⁰. Эти характеристики должны быть представлены в отдельном нормативном документе на субстанцию и обеспечить возможность ее идентификации и количественного определения. И все эти определения не описывают правильно действующее вещество радиофармпрепарата, которое содержит радионуклид в определенной химической форме и, как правило, образуется в процессе синтеза РФЛП. Количество молекул этого вещества в составе препарата соответствует количеству атомов радионуклида (в идеальном случае 100%-ного включения одного радиоактивного атома в молекулу химического прекурсора) и изменяется во времени в соответствии с периодом полураспада радионуклида. С этой точки зрения следует отметить, что ОФС «Субстанции для фармацевтического применения» (03/2018:2034), принятая к включению в первый том Фармакопеи ЕАЭС, содержит, так же как и аналогичная статья Европейской фармакопеи¹¹, указание, что «...не распространяется на химические прекурсоры для радиофармацевтических препаратов...», которые описываются в отдельной ОФС. В третьем приложении к любым принятым вариантам Правил надлежащей производственной практики (GMP)¹² предлагается применять часть II Правил, то есть требования к производству АФС, к промежуточным продуктам, получаемым после выполнения стадий химического синтеза (если выполнено) и очистки препаратов радионуклидов, полученных в реакторах и на циклотронах. Это предложение достаточно трудно для понимания и поэтому трактуется различными экспертами произвольно. К сожалению, официальных публикаций, уточняющих это положение, до настоящего времени нет. В одной из директив Европейской ассоциации ядерной медицины (EANM), опубликованной в 2008 г. [9], предложено рассматривать в качестве АФС элюат радионуклидного генератора или вообще исходный препарат радионуклида, используемый при производстве РФЛП. В нерадиоактивных

¹⁰ Федеральный закон Российской Федерации от 24 марта 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», далее Федеральный закон № 61-ФЗ;

ГОСТ Р 52249-2009 GMP Правила производства и контроля качества лекарственных средств;

Информационный справочник понятий, применяемых в рамках Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств. http://www.eurasiancommission.org/ru/act/txnnreg/deptexreg/LS1/Pages/pharm_glossary_new.aspx

¹¹ Chemical precursors for radiopharmaceutical preparations. Ph. Eur. 9th ed. 07/2016:2902.

¹² Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 г. № 77.

Таблица 2. Препараты радионуклидов, включенные в Государственный реестр лекарственных средств и применяемые в качестве фармацевтической субстанции**Table 2.** Radionuclide products included in the State Register of Medicines and used as active pharmaceutical ingredients

Дата Date	Наименование Name	Лекарственная форма Dosage form	Дозировка Strength	Примечания Notes
18.11.2011	Индия хлорид, ^{111}In Indium chloride, ^{111}In	Раствор для приготовления радиофармацевтического препарата для внутривенного введения Solution for the preparation of a radiopharmaceutical for intravenous administration	120; 240; 500; 1000; 2000 МБк (MBq)	Зарегистрирован как ЛС, но таковым не является The product is registered as an FPP, but it is not
13.01.2014	Натрия пертехнетат, ^{99m}Tc , экстракционный Sodium pertechnetate, ^{99m}Tc , extractable	Раствор для внутривенного введения и приема внутрь Solution for intravenous infusion and for oral use	1; 1,5; 3; 5; 8; 10 ГБк (GBq)	Зарегистрирован как ЛС, применяется как РФЛП и АФС The product is registered as an FPP and is used both as an FPP and an API
27.03.2019	Лютеция хлорид, ^{177}Lu Lutetium chloride, ^{177}Lu	Субстанция-раствор API solution	370 МБк (MBq)	
07.12.2012	Натрия перренат, ^{188}Re , экстракционный Sodium perrenate, ^{188}Re , extractable	Раствор для получения радиофармацевтического препарата Solution for the preparation of a radiopharmaceutical	1; 2; 3; 6 ГБк (GBq)	
22.05.2015	Натрия йодид [^{131}I] И-РА-7 Sodium iodide [^{131}I] I-RA-7	Раствор для приготовления радиофармацевтического препарата Solution for the preparation of a radiopharmaceutical	11,1; 14,8; 18,5; 22,0; 25,9; 29,6; 3,7; 7,4 ГБк (GBq)	ООО «Институт изотопов», Венгрия Institute of Isotopes Co., Ltd., Hungary

наборах к радионуклидным генераторам в качестве АФС рассматривается «...часть состава, которая предназначена для переноса или связывания радионуклида или для обеспечения его связывания». В директиве Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA)¹³ как материнские, так и дочерние радионуклиды рассматриваются как АФС наряду с химическими предшественниками для мечения. Отмечается, что радиоактивные субстанции должны быть по возможности описаны, но не всегда выделяются во избежание проблем с радиолизом.

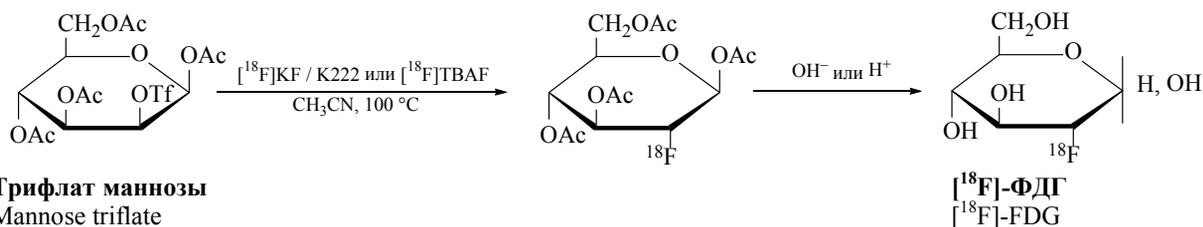
В России подобных руководящих документов не существует. Очевидно, предстоит решить, что и по каким правилам должно быть зарегистрировано в качестве химических предшественников и радиоактивных ингредиентов (субстанций, предшественников) для производства/изготовления РФЛП. До настоящего времени всего 3 радиоактивных АФС (или растворов для приготовления радиофармацевтического препарата) (табл. 2) включены в Государственный реестр лекарственных средств (ГРЛС). Еще 2 препарата, «Натрия пертехнетат ^{99m}Tc , экстракционный» и «Индия хлорид, ^{111}In », включены как ЛС, хотя последний таковым не является и используется при изготовлении в медицинских организациях РФЛП «Октреотид, ^{111}In ».

Среди препаратов для ПЭТ, применяемых в настоящее время, в ГРЛС присутствует только Фтордезоксиглюкоза, ^{18}F (ФДГ, ^{18}F). [^{18}F]Фторид может применяться как исходный радионуклидный

препарат в синтезе других РФЛП, а также самостоятельно (в изотоническом растворе NaCl) в качестве остеотропного препарата для ПЭТ. Однако далеко не в каждом синтезе он может и должен быть выделен и полностью проанализирован по всем показателям до синтеза другого РФЛП.

Например, в синтезе ФДГ, ^{18}F продукт, полученный непосредственно в циклотроне в результате облучения протонами воды, обогащенной по изотопу ^{18}O , $^{18}\text{F}/[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$, поступает на анионообменный картридж. Это позволяет отделить [^{18}F]фторид-ионы от неиспользованной исходной [^{18}O]H₂O и различных примесей, а ^{18}F элюируется с картриджа раствором, содержащим K₂CO₃ и межфазный катализатор (Krytofix 2.2.2 или третбутиламмоний карбонат — ТВА) в смеси ацетонитрила с водой. Элюируемый комплекс [^{18}F]KF/Krytofix (или [^{18}F]TBAF) представляет собой соль органического катиона и неорганического аниона, растворимую в ацетонитриле и превращающую ^{18}F в очень реакционноспособную форму, пригодную для получения различных фторорганических соединений (рис. 1) [10]. Нужно, не теряя времени на распад и во избежание радиолиза, выполнить следующие стадии синтеза препарата: обезвоживание фторида, фторирование трифлата маннозы, гидролиз промежуточного меченого продукта для удаления защитных ацетильных групп («снятие защиты») и очистку продукта (выделение [^{18}F]ФДГ из реакционной смеси методом твердофазной экстракции на одноразовых картриджах). Далее следуют корректировка pH

¹³ Guideline on radiopharmaceuticals. EMEA/CHMP/QWP/306970/2007.



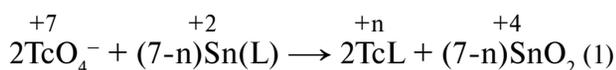
Трифлат маннозы
Mannose triflate

Рис. 1. Схема нуклеофильного синтеза $[^{18}\text{F}]\text{ФДГ}$; OTf — трифлатная «уходящая» группа; OAc — ацетатная «защитная» группа
Fig. 1. The scheme of $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ nucleophilic synthesis; OTf — triflate leaving group; OAc — acetate protecting group

(регламентированные значения 5–7) и изотоничности и онлайн-стерилизация (мембранное асептическое фильтрование). Все эти операции реализуются в автоматическом режиме без вмешательства оператора в модуле синтеза, размещенном в защитном радиохимическом боксе. Последняя операция выполняется на входе в другой, фасовочный бокс, где в асептических условиях проводится наполнение. Последовательность технологических операций процесса отображается на мониторе компьютера¹⁴.

Таким образом, в этом процессе имеет смысл говорить о химических предшественниках — трифлате маннозы и $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ [11]. Есть ли смысл рассматривать полученный продукт (нерасфасованный раствор $[^{18}\text{F}]\text{ФДГ}$) как АФС, вопрос дискуссионный. С точки зрения авторов, это вполне соответствует дословному переводу на английский «*bulk solution*». Этот раствор может быть расфасован непосредственно в месте производства, а может быть передан в другое помещение или организацию, где будет выполняться фасование монодоз для конкретных пациентов.

РФЛП технеция-99м получают непосредственно в медицинских организациях путем растворения нерадиоактивного лиофилизата в элюате генератора, представляющего собой изотонический раствор NaCl , содержащий натрия пертехнетат, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ в концентрации $\sim 10^{-7}$ – 10^{-8} моль/л. В результате происходит реакция восстановления и образования комплекса $^{99\text{m}}\text{Tc}$, которую условно изображают следующим образом [12]:



Условность этой записи объясняется тем, что не всегда ясно полученное в результате реакции окислительное состояние $^{99\text{m}}\text{Tc}$, а также может ли входить двух- или четырехвалентное олово в состав образующихся комплексов. Кроме того, несмотря на многолетние усилия большого количества исследователей химии технеция, не для всех комплексов, которые с той или иной долей вероятности

могут образоваться в составе $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -РФЛП, однозначно установлены их состав и структура. И даже там, где удалось синтезировать и исследовать аналогичные соединения ^{99}Tc (долгоживущий изотоп технеция, период полураспада $2,13 \cdot 10^5$ лет), нельзя утверждать, что они полностью идентичны тем, которые образуются в РФЛП, где реакция проводится при соотношениях «металл : лиганд», далеких от эквимольярных. Поэтому условно в качестве АФС для этой группы РФЛП рассматривают элюат генератора. Другие вещества, которые участвуют в приведенной выше реакции (восстановитель, комплексообразующий агент), входят в состав лиофилизата и могут рассматриваться как химические предшественники. Аналогичные подходы имеет смысл использовать для РФЛП, получаемых на основе других радионуклидных генераторов, или поставляемых отдельно растворов радионуклидов, например ^{111}In , ^{177}Lu или ^{90}Y .

Нерешенным, по крайней мере в нашей стране, остается вопрос — а что такое лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения, например «Пентатех, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ »? Это лиофилизированная смесь нерадиоактивных веществ, не являющаяся лекарственным препаратом. На сегодняшний день в ведущих фармакопоях мира отсутствуют сведения о лиофилизатах для приготовления РФЛП. В нашей стране они регистрируются и включены в ГРЛС как лекарственные средства (5 лиофилизатов включены в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов). По видимому, стоит подумать о специальных подходах к испытаниям и регистрации этой группы предшественников для изготовления РФЛП непосредственно в медицинских организациях.

ОСНОВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Проблемы обеспечения качества РФЛП в свете специфики этой группы ЛС обсуждаются в специальной литературе постоянно, и здесь упомянуты только несколько публикаций последних лет, в которых имеются ссылки на более ранние исследования и обзоры [3, 13, 14]. Отмечается, что пока нет

¹⁴ International Atomic Energy Agency. Cyclotron produced radionuclides: Guidance on facility design and production of fluorodeoxyglucose (FDG), Radioisotopes and radiopharmaceuticals Series No. 3, IAEA. Vienna; 2012.

¹⁵ Good practice for introducing radiopharmaceuticals for clinical use. IAEA-TECDOC-1782. Vienna; 2016.

абсолютного единства в подходах регуляторных систем США и ЕС. Тем не менее необходимость выработки единых подходов очевидна.

Действующим веществом в составе любого РФЛП является соединение, содержащее радионуклид и присутствующее в микроконцентрации. Поэтому необходимо доказательство подлинности по радионуклиду и определение его активности. Необходимо также установить наличие или отсутствие радионуклидных примесей, которые могут стать причиной некачественной визуализации или необоснованных дополнительных лучевых нагрузок. Это решается с помощью ядерной спектрометрии и специальных детекторов радиоактивности — докалибраторов. Причем, если речь идет о гамма-излучателях, измерения могут быть проведены непосредственно в первичной упаковке РФЛП. Для таких определений весьма полезной представляется ОФС, рекомендованная к включению в Фармакопею ЕАЭС¹⁶, являющаяся отредактированным переводом аналогичной статьи в Европейской фармакопее 8 издания. Однако обе статьи предполагают использование стандартных образцов для всех измерений, что в настоящее время в России является проблемой (не выпускаются серийно более 20 лет).

Безусловно, необходимо доказательство подлинности и, по возможности, количественное определение химического предшественника, в структуру которого нужно ввести радионуклид. Следует отметить, что, как правило, содержание этого вещества в РФЛП значительно ниже концентраций, при которых проявляется его фармакологическое действие. Здесь могут быть использованы обычные фармакопейные методы, однако с учетом необходимости использования ультрамалых объемов проб для анализа и минимального времени.

Основное, что определяет путь РФЛП в организме, а следовательно, его эффективность и безопасность (в свете исключения необоснованного облучения), это процентное содержание радионуклида в необходимой химической форме, то есть радиохимическая чистота (РХЧ). Для определения этого показателя допускается использование любого метода аналитического разделения — тонкослойной (ТСХ), бумажной, жидкостной хроматографии, в том числе высокоэффективной (ВЭЖХ), электрофореза и др. В последние годы наиболее часто используются ТСХ или ВЭЖХ. После разделения положение зон радиоактивности определяют с помощью соответствующих коллимированных счетчиков (соотношения измеренной активности определяют соотношения

концентраций радиоактивных химических форм). В некоторых случаях положение пятен и участков можно химически идентифицировать путем сравнения с соответствующими растворами такого же химического вещества (нерадиоактивного), используя соответствующий метод детектирования. Активность может быть измерена путем интегрирования с использованием сканеров или цифровых счетчиков.

Поиск адекватной системы, например в ТСХ это «неподвижная фаза/растворитель», представляет достаточно сложную задачу. Далеко не всегда удается разделить все радиохимические компоненты РФЛП. И тогда проводится определение известных радиохимических примесей (РХП) путем хроматографирования образцов РФЛП в разных системах. Например, для некоторых препаратов ^{99m}Tc отдельно находят содержание свободных ^{99m}TcO₄⁻, а в другом эксперименте — содержание гидролизованного восстановленного ^{99m}Tc (условно принятое всеми наименованием, хотя точный состав неизвестен). Сумма результатов определения этих примесей вычитается из 100 (%), а разность принимается за результат определения РХЧ. В идеальном случае значение РХЧ должно быть близко к 100 %, в частных монографиях или оригинальных публикациях можно встретить значения РХЧ ≥ 95 %, иногда даже 98 %. При метрологической аттестации методик измерений при определении РХЧ установлено, что результаты такого уровня не всегда являются статистически достоверными [15, 16], поэтому более правильным представляется указание в нормативной документации предела по РХЧ не ниже 90 %, что часто встречается в зарубежных фармакопеях.

Еще более сложной задачей является процедура валидации методики определения радиохимической чистоты РФЛП. ОФС¹⁷, регламентирующая процесс валидации, так же как и Руководство¹⁸, принятое на уровне ЕАЭС, не могут быть в полном объеме применены к валидации методики определения РХЧ радиофармпрепаратов, хотя и не содержат соответствующих указаний. Показатели РХЧ (или РХП) устанавливают относительное содержание нужного радиоактивного компонента (или примесей), определенное соотношение которых в принципе невозможно создать искусственно или изменить. Тем более не существует линейной зависимости содержания примесей от объемной активности изготовленного РФЛП. Поэтому выполнение тестов «Предел количественного определения», «Аналитическая область методики», «Правильность» и «Линейность» необходимо адаптировать и скорректировать.

¹⁶ 2.2.66. Обнаружение и измерение радиоактивности. <http://www.eurasiancommission.org/ru/act/txreg/deptexreg/LS1/Documents/2.2.66%20%D0%9E%D0%B1%D0%BD%D0%B0%D1%80%D1%83%D0%B6%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B5%20%D0%B8%20%D0%B8%D0%B7%D0%BC%D0%B5%D1%80%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B5%20%D1%80%D0%B0%D0%B4%D0%B8%D0%BE%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%B2%D0%BD%D0%BE%D1%81%D1%82%D0%B8.pdf>

¹⁷ ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

¹⁸ Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. Утверждено Решением Коллегии ЕЭК от 17 июля 2018 г. № 113.

В оригинальной литературе можно найти отдельные публикации [17–19], в которых не обсуждается, почему приведены результаты лишь по отдельным тестам. Подробное исследование выполнено в ЮАР в рамках магистерской работы по поиску методик анализа, наиболее приемлемых по стоимости и простоте выполнения в государственной больнице¹⁹. Показано, что выполнение стандартных подходов к валидации не может быть реализовано в полном объеме. Некоторые примеси не могут быть выделены индивидуально, есть трудности в выполнении тестов «Точность», «Специфичность» и «Линейность». Проблема активно обсуждается в последние годы [20, 21]. Результаты, полученные в этом направлении авторами настоящей работы, и некоторые практические предложения являются предметом отдельной публикации, которая готовится к печати.

В марте 2019 г. в ECA Academy (Вена) была проведена конференция по вопросам качества и безопасности радиофармацевтических препаратов, где подробно обсуждались вопросы валидации методов контроля РФЛП. Участникам было представлено выпущенное в 2018 г. Европейским Директоратом по качеству лекарственных средств и здравоохранению (European Directorate for the Quality of Medicines, EDQM) «Руководство по разработке монографий на радиофармацевтические препараты»²⁰.

В отношении показателя «Описание» в этом Руководстве приведена следующая формулировка: «Утверждения в разделе «Описание» не должны трактоваться в строгом смысле и не являются аналитическими требованиями. Описание внешнего вида препарата дается для информации». Дело в том, что провести строгое определение прозрачности (степени мутности) или степени окраски растворов РФЛП методами, описанными в соответствующих ОФС, не представляется возможным. Рассмотреть что-либо в единичной фасовке (1–2 мл) трудно, а выполнять эти тесты с большими объемами нерасфасованного препарата не всегда возможно, так как объем всей серии может быть меньше количества, требуемого для определения. Главное, что это опасно, поскольку связано с превышением предельно допустимых доз облучения хрусталика глаза персонала [22]. По этой причине использование любых методов контроля качества РФЛП, связанных с визуальными определениями, необходимо минимизировать или по возможности исключить. Возможность и необходимость подобных определений должна устанавливаться на основе анализа рисков

с учетом доступности специального оборудования для реализации дистанционного контроля непосредственно в горячей камере или боксе.

Важным представляется описание концепции «Максимальной рекомендуемой дозы в миллилитрах», так как для РФЛП регулярно, в соответствии с периодом полураспада радионуклида, приходится менять объем вводимой пациенту дозы, чтобы выполнялось требование вводимой дозы по активности (в МБк). Поэтому не всегда понятно обоснование предельных концентраций примесей и бактериальных эндотоксинов. Вместе с тем стандартного протокола для такого определения еще не существует.

Дискуссии по поводу маркировки РФЛП с использованием идентификационных знаков в России временно остановлены²¹. Однако актуальность создания системы прослеживания движения РФЛП отмечается в мировом сообществе [23–25]. По мнению авторов, такая система необходима для точной доставки назначенных доз РФЛП конкретным пациентам. Это особенно актуально в радионуклидной терапии. Но эта система не может и не должна быть общей с лекарственными препаратами, реализуемыми через аптечную сеть.

Примерно половина текста цитируемого Руководства²² посвящена валидации аналитических методик. Обобщенные сведения по методикам, применяемым только для РФЛП, представлены в таблице 3, «адаптированной к определенному классу радиофармпрепаратов».

Следует отметить, что в 2006 г. в России был издан сборник²², включающий «...требования к построению, изложению и оформлению проектов фармакопейных статей на радиофармацевтические препараты», а также «...на радиофармацевтические препараты, приготавливаемые на месте применения и лиофилизаты для их приготовления». Материалы были подготовлены сотрудниками ГНЦ «Институт биофизики» (в настоящее время ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России). Очевидно, что сейчас самое время вновь выполнить разработку подобных рекомендаций в свете возможного обращения РФЛП на территории ЕАЭС и с учетом современного мирового опыта, обобщенного в издании EDQM.

ПРОИЗВОДСТВО/ИЗГОТОВЛЕНИЕ РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ

Производство РФЛП всегда было маломасштабным и мелкосерийным, по крайней мере в нашей стране. Тем не менее это лицензируемый вид деятельности, и все отечественные производители

¹⁹ Mambilima N. Validation of radiochemical purity analysis methods used in two tertiary public hospitals in South Africa. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Nuclear Medicine in the Faculty of Medicine and Health Sciences at Stellenbosch University, Stellenbosch University; South Africa, 2016. <https://pdfs.semanticscholar.org/374b/8b40aa5df65b1bf6f443e4c23ed273a4ea8d.pdf>

²⁰ Guide for the elaboration of monographs on radiopharmaceutical preparations. European Pharmacopoeia; 2018.

²¹ Федеральный закон Российской Федерации от 28 ноября 2018 г. № 449-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации по вопросу ввода в гражданский оборот лекарственных препаратов для медицинского применения».

²² Сборник методических рекомендаций по стандартизации лекарственных средств. М.: Пеликан; 2006.

Таблица 3. Аналитические методики, применяемые в контроле качества радиофармацевтических препаратов, подлежащие валидации (составлено по сборнику методических рекомендаций²²)**Table 3.** Analytical procedures that are used in the quality control of radiopharmaceuticals and that require validation (based on information provided in²²)

Характеристика Parameters	Тип аналитической методики Analytical procedure						
	Подлинность по радионуклиду, приibl. $T_{1/2}$ Radionuclide identification (approx. $T_{1/2}$)	Подлинность по радионуклиду (спектрометрия) Radionuclide identification (spectrometry)	Радионуклидная чистота (предел) Radionuclidic purity (limit test)	Радионуклидная чистота (спектрометрия) Radionuclidic purity (spectrometry)	Радиохимическая подлинность (ЖХ/ТСХ/БХ) Radiochemical identity (LC/TLC/PC)	Радиохимическая чистота* (ЖХ/ТСХ/БХ), % Radiochemical purity* (LC/TLC/PC)	Радиоактивность (количественное определение) Radioactivity (assay)
Точность Accuracy	–	–	–	+	–	+	+
Прецизионность Precision							
Повторяемость Repeatability	+	–	–	(+)	–	(+)	+
Внутрилабораторная прецизионность Intermediate Precision	–	–	–	(+)	–	(+)	–
Специфичность Specificity	+	+	+	+	+	+	+
Предел обнаружения Detection Limit	–	–	+	–	–	–	–
Предел количественного определения Quantification Limit	–	–	–	+	–	+	–
Линейность Linearity	+	–	–	+	–	+	+
Диапазон применения Range	+	–	–	+	–	+	+

* Измерения радиоэнантиомерной чистоты должны быть проведены аналогичным образом. / * Radioenantiomeric purity measurements should be validated in a similar way.

Примечание. (+) – не всегда возможно (например, короткий период полураспада); ЖХ – жидкостная хроматография; ТСХ – тонко-слойная хроматография; БХ – бумажная хроматография.

Note. (+) – not always feasible (e.g. because of a short half-life); LC – liquid chromatography; TLC – thin-layer chromatography; PC – paper chromatography.

радиофармацевтической продукции имеют лицензии Минпромторга России и действующие регистрационные удостоверения на выпускаемую продукцию. Необходимо отметить, что за последние 10 лет не начат выпуск ни одного нового РФЛП, поскольку предприятиям не под силу самостоятельное финансирование новых разработок параллельно с реконструкцией и переоборудованием производства в соответствии с современными требованиями²³. Позитивную роль в развитии производства РФЛП сыграла реализация Федеральной целевой программы «ФАРМА-2020» (далее ФЦП «ФАРМА-2020»), в рамках которой были профинансированы доклинические исследования более двадцати РФЛП для всех направлений современной ядерной медицины — однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (^{99m}Tc , ^{111}In), позитронной эмиссионной томографии (^{18}F , ^{68}Ga , ^{89}Zr)

и радионуклидной терапии (^{153}Sm , ^{188}Re , ^{90}Y). Реализация этих разработок позволит внести конкретный вклад в лечебно-диагностическую программу повышения продолжительности жизни населения, а также значительно снизить финансовые затраты на лечение за счет повышения эффективности ранней диагностики и сокращения сроков стационарного и амбулаторного лечения. Однако остаются неясными сроки реализации этого проекта. Дело в том, что схема финансирования клинических исследований, предусмотренная ФЦП «ФАРМА-2020», абсолютно неприемлема для бюджетных организаций — заявитель должен сначала полностью самостоятельно оплатить все расходы, а в дальнейшем возможно получение субсидии для погашения затрат в размере 50 %. Частные компании не рискуют брать на себя расходы по новым препаратам, клиническая эффективность

²³ Приказ Министерства промышленности и торговли Российской Федерации от 14 июня 2013 г. № 916 «Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств».

которых не доказана. Если в ближайшее время клинические исследования не будут начаты, может возникнуть еще одна проблема, когда регуляторные органы будут принимать на экспертизу отчеты по доклиническим исследованиям только от организаций, имеющих лицензии в соответствии с требованиями GLP²⁴. В настоящее время такие организации (одновременно имеющие лицензии на право работ с ИИИ) в нашей стране отсутствуют. То есть не исключено, что через некоторое время выяснится, что доклинические исследования необходимо повторить в лицензированной организации.

Необходимо отметить, что при выполнении работ по доклиническим исследованиям РФЛП в ряде случаев приходилось выполнять целый ряд дорогостоящих, ненужных и опасных (с точки зрения облучения персонала) исследований так, как это рекомендовано в Руководстве²⁵, которое никаких упоминаний о радиофармпрепаратах не содержит и их специфику не учитывает. Аналогичная ситуация существует и в отношении клинических исследований РФЛП, подходы к которым связаны с необоснованными затратами времени и финансов и лишними лучевыми нагрузками как для пациентов, так и для персонала. Таким образом, необходима срочная разработка специальных руководств для РФЛП. Такая работа сейчас проводится и в ЕС, где в июне 2019 г. завершено обсуждение актуализированного проекта ЕМА²⁶ по доклиническим исследованиям радиофармпрепаратов.

Термин «изготовление» радиофармацевтических лекарственных препаратов начали применять с вступлением в силу Федерального закона № 61-ФЗ, в котором впервые было приведено положение о возможности применения незарегистрированных РФЛП в медицинских организациях, их изготавливающих. Это было вполне прогрессивным решением, принятие которого обусловило возможность развития ядерной медицины, в первую очередь ПЭТ, в нашей стране, где за годы перестройки сложилось значительное отставание от ведущих стран мира. Возникла некоторая аналогия ситуации, существующей в США или ЕС. Например, в соответствии со статьей 7 Директивы 2001/83 ЕС²⁷: «Торговая лицензия не требуется для радиофармацевтического лекарственного средства, приготовленного во время применения лицом или учреждением, уполномоченным, в соответствии с национальным законодательством, применять такие лекарственные средства в лицензированной

ных учреждениях здравоохранения исключительно из лицензированных генераторов радионуклидов, наборов или прекурсоров радионуклидов в соответствии с инструкциями производителя». Однако соответствующий подзаконный акт²⁸ был принят только через 5 лет после вступления в силу Федерального закона № 61-ФЗ. До настоящего времени не совсем понятно, чему должен соответствовать процесс приготовления (или изготовления) и контроля качества РФЛП, если он реализуется в организации, не имеющей лицензии на производство ЛС, и есть ли необходимость отражать изготовление РФЛП в лицензии на фармацевтическую деятельность. Вновь проектируемые и строящиеся ПЭТ-центры (полноценные, имеющие циклотрон, радиохимическую лабораторию и участок контроля качества) в целом организуют работу в соответствии с требованиями «Надлежащей производственной практики». В любом вновь построенном центре достаточно быстро осваивается метод получения и контроля качества [¹⁸F]ФДГ, но уже не все стремятся зарегистрировать этот препарат. Интересная ситуация — ни в Федеральном законе № 61-ФЗ, ни в Приказе²⁹, ни в каком-либо другом документе нет никаких указаний, в каком объеме и нужно ли вообще проводить доклинические и/или клинические исследования радиофармпрепарата, который не будет зарегистрирован. Фактически на сегодня многократно проведены доклинические исследования ФДГ, хотя, по мнению авторов, было бы вполне достаточно сведений о результатах контроля качества продукции каждого нового производителя. Следует определить, каким минимальным объемом сведений или собственных результатов должна обладать организация, изготавливающая новый или воспроизведенный РФЛП для введения пациентам. Не решены также проблемы необходимости регистрации или отсутствия таковой исходных реагентов, используемых при изготовлении РФЛП. Определенная работа в этом направлении ведется, но четкого понимания того, что и как должно регистрироваться, нет.

Более понятна ситуация с изготовлением РФЛП на основе генератора ^{99m}Tc. Это направление существует давно, большинство разработок было выполнено еще в СССР, поэтому изготовление проводится с использованием зарегистрированных генераторов (причем дважды — генератор как медицинское изделие, а элюат как лекарственное средство) и наборов реагентов (лиофилизатов). Однако во всем мире обязательно проводится контроль качества РФЛП,

²⁴ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

²⁵ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2012.

²⁶ Guideline on the non-clinical requirements for radiopharmaceuticals. Draft EMA/CHMP/SWP/686140/2018.

²⁷ Директива 2001/83/ЕС Европейского парламента и Совета ЕС от 6 ноября 2001 г. «О своде законов Сообщества в отношении лекарственных средств для человека с изменениями». <http://mcg.com.ua/uploads/29092014/46cca89021f682431e7826f9d54e23aa.pdf>

²⁸ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 27 апреля 2015 г. № 211н «Об утверждении порядка изготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов непосредственно в медицинских организациях».

²⁹ Там же.

изготовленного непосредственно на месте применения. В развитых странах более 20 лет существует практика поставки готовых инъекций (Unit Dose Service) из специализированных «ядерных» аптек (Nuclear Pharmacy), представляющих собой производственные участки по изготовлению радиофармацевтической продукции. Именно поэтому в фармакопиях США и Европы приводятся монографии на готовые инъекции радиофармпрепаратов. В 2007 г. Комитет по радиофармации EANM подготовил и опубликовал на сайте EANM документ³⁰ «Руководящие принципы современной надлежащей радиофармацевтической практики (CGRPP) приготовления радиофармацевтических препаратов». Документ включал две части: «Руководство по современной надлежащей практике приготовления радиофармпрепаратов (сGRPP) на основе наборов к генераторам» (часть А) и «Рекомендации по современной надлежащей практике приготовления радиофармпрепаратов (сGRPP) для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и других локально получаемых радиофармацевтических препаратов» (часть В). В 2010 г. часть В была существенно дополнена с учетом публикации FDA³¹ и опубликована в журнале EANM отдельной статьей [26]. Позже, в 2014 г., появилось «Руководство по надлежащей практике изготовления радиофармпрепаратов с использованием модулей синтеза» [27], а в 2017 г. — «Руководство по валидации и квалификации процессов и операций, связанных с радиофармацевтическими препаратами» [28].

Эти руководства подготовлены ведущими специалистами государств ЕС, имеющими многолетний опыт в создании технологий и методов контроля РФЛП. Никаких аналогичных документов в России и/или ЕАЭС нет, и очевидно, что их необходимо срочно разрабатывать, но с учетом возможностей, имеющихся в наших организациях.

У авторов имеется некоторый опыт обучения персонала российских лабораторий и отделений радионуклидной диагностики методам контроля радиохимической чистоты изготавливаемых РФЛП, содержащих ^{99m}Tc. Практика показывает, что как персонал медицинских организаций, занятый изготовлением препаратов (обычно медицинские сестры), так и администрация большинства этих организаций не воспринимают с энтузиазмом необходимость проведения мероприятий по обеспечению качества применяемых РФЛП. При этом есть достаточно оснований утверждать, что технические ошибки персонала при изготовлении РФЛП имеют место, но это предмет отдельной публикации. Интересно, что в научной периодике по ядерной медицине регулярно появляются статистические исследования по оценке качества (фактически это можно

отнести к фармаконадзору) изготавливаемых РФЛП [29, 30], где авторы приходят к выводу, что контроль необходим, так же, как и специализированная подготовка персонала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для реализации исключительных возможностей методов ядерной медицины необходимы высокие технологии не только на этапе их клинического применения, но и на предшествующем этапе — начиная с производства радионуклидов в медицинских циклотронах, реакторах или радионуклидных генераторах, введения радиоактивной метки в выбранное положение молекулы радиотрейсера и заканчивая получением стерильной инъекционной формы РФЛП. Эти задачи решает радиофармацевтика, уровень развития которой играет определяющую роль в эффективности использования методов ядерной медицины. В последние годы это направление активно развивается в нашей стране. В настоящей работе авторы попытались только обозначить основные проблемы, специфические для РФЛП, и направления их решения.

Особенно актуальны перечисленные проблемы в свете развития в ближайшие годы тераностической ядерной медицины и появления группы новых РФЛП для радионуклидной терапии. В этом направлении тем более важны правильные дозиметрические оценки размера рекомендуемой дозы для введения конкретному пациенту в точно установленное время. Актуальным становится разработка новых подходов к регуляторным вопросам перехода от доклинических исследований радиофармпрепаратов к клиническим, поскольку, по мнению экспертов, отсутствие адекватных норм по проведению таких исследований становится преградой для быстрого внедрения достижений ядерной медицины. Проект «Radiopharmaceutical regulations» реализуется в рамках EANM группой ведущих экспертов под руководством С. Decristoforo [31]. Очевидно, что и в России настало время пересмотреть или выработать вновь специальные подходы к регуляторным проблемам обращения РФЛП, гармонизированным с международными — их разработки, исследований, испытаний, стандартов применения и других аспектов.

Благодарности. Работа проведена без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

³⁰ Guidelines on current good radiopharmacy practice (сGRPP) in the preparation of radiopharmaceuticals; version 2. March 2007. EANM Radiopharmacy Committee. https://www.eanm.org/publications/guidelines/gl_radioph_cgrrp.pdf

³¹ Food and Drug Administration. Guidance: PET Drugs — Current Good Manufacturing Practice (CGMP). US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). December 2009. <https://www.fda.gov/media/71013/download>

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Shaw SM, Ice RD. Nuclear pharmacy. Part I: Emergence of the speciality of nuclear pharmacy. *J Nucl Med Technol.* 2000;28(1):8–11. PMID: 10763775
2. Dar MA, Masoodi MH, Farooq S. Medical uses of radiopharmaceuticals. *Pharmatutor.* 2015;3(8):24–9.
3. Huang YY. An overview of PET radiopharmaceuticals in clinical use: regulatory, quality and pharmacopeia monographs of the United States and Europe. In: Shahzad A, ed. *Nuclear Medicine Physics.* IntechOpen; 2019. <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79227>
4. Blum KS, Büsch N, Beyer T, Rausch I, Freudenberg LS. In patients we trust: reliability of self-reported weight and height in nuclear medicine patients. *J Nucl Med Technol.* 2019;47(2):133–6. <https://doi.org/10.2967/jnm.118.216317>
5. Онищенко ГГ, Попова АЮ, Романович ИК, Водоватов АВ, Башкетова НС, Историк ОА и др. Современные принципы обеспечения радиационной безопасности при использовании источников ионизирующего излучения в медицине. Часть 1. Тенденции развития, структура лучевой диагностики и дозы медицинского облучения. *Радиационная гигиена.* 2019;12(1):6–24. [Onishchenko GG, Popova AYU, Romanovich IK, Vodovатов AV, Bashketova NS, Istoric OA, et al. Modern principles of the radiation protection from sources of ionizing radiation in medicine. Part 1: Trends, structure of radiation diagnostics and doses from medical exposure. *Radiatsionnaya gigiena = Radiation Hygiene.* 2019;12(1):6–24 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21514/1998-426X-2019-12-1-6-24>
6. Онищенко ГГ, Попова АЮ, Романович ИК, Водоватов АВ, Башкетова НС, Историк ОА и др. Современные принципы обеспечения радиационной безопасности при использовании источников ионизирующего излучения в медицине. Часть 2. Радиационные риски и совершенствование системы радиационной защиты. *Радиационная гигиена.* 2019;12(2):6–24. [Onishchenko GG, Popova AYU, Romanovich IK, Vodovатов AV, Bashketova NS, Istoric OA, et al. Modern principles of the radiation protection from sources of ionizing radiation in medicine. Part 2: Radiation risks and development of the system of radiation protection. *Radiatsionnaya gigiena = Radiation Hygiene.* 2019;12(2):6–24 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21514/1998-426X-2019-12-2-6-24>
7. Кашчев ВВ, Прыхин ЕА. Медицинское диагностическое облучение: проблема радиационной безопасности. Обзор. *Радиация и риск.* 2018;27(4):49–64. [Kashcheev VV, Pryakhin EA. Medical diagnostic imaging: radiation safety issues. Review. *Radiatsiya i risk = Radiation and Risk.* 2018;27(4):49–64 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21870/0131-3878-2018-27-4-49-64>
8. Andersson M, Eckerman K, Mattsson S. Lifetime attributable risk as an alternative to effective dose to describe the risk of cancer for patients in diagnostic and therapeutic nuclear medicine. *Phys Med Biol.* 2017;62(2):9177–88. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/aa959c>
9. Verbruggen A, Coenen HH, Deverre JR, Guilloteau D, Langstrom B, Salvadori PA, Halldin C. Guideline to regulations for radiopharmaceuticals in early phase clinical trials in the EU. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2008;35(11):2144–51. <https://doi.org/10.1007/s00259-008-0853-7>
10. Krasikova R. PET Radiochemistry automation: state of the art and future trends in ¹⁸F-nucleophilic fluorination. *Current Organic Chemistry.* 2013;17(19):2097–107. <https://doi.org/10.2174/13852728113179990102>
11. Студенцов ЕП, Непорожнева ОВ, Головина АА, Новикова НИ, Орловская ВВ, Красикова РН. Методы получения и физико-химические свойства производных углеводов, используемых в синтезе и контроле качества радиофармпрепарата 2-[¹⁸F]-2-дезоксид-Д-глюкоза. *Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета).* 2015;32(58):69–79. [Studentsov EP, Neporoghnova OV, Golovina AA, Novikova NI, Orlovskaja VV, Krasikova RN. Methods of preparation and physicochemical properties of carbohydrate derivatives used in synthesis and quality control of radiopharmaceutical 2-[¹⁸F]-2-deoxy-D-glucose. *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo instituta (tekhnicheskogo universiteta) = Bulletin of the Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University).* 2015;32(58):69–79 (In Russ.)]
12. Кодина ГЕ, Красикова РН. Методы получения радиофармацевтических препаратов и радионуклидных генераторов для ядерной медицины. М.: МЭИ; 2014. [Kodina GE, Krasikova RN. *Methods for obtaining of radiopharmaceuticals and radionuclide generators for nuclear medicine.* Moscow: MEI; 2014 (In Russ.)]
13. Sharma S, Baldi A, Sharma R. Radiopharmaceuticals regulations on bioavailability and bioequivalence: present status and future requirements. *Mod Appl Bioequiv Availab.* 2017;1(4):555567. <https://doi.org/10.19080/MABB.2017.01.555567>
14. Schwarz SW, Decristoforo C, Goodbody AE, Singhal N, Saliba S, Ruddock P, et al. Harmonization of United States, European Union and Canadian first-in-human regulatory requirements for radiopharmaceuticals — is this possible? *J Nucl Med.* 2019;60(2):158–66. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.209460>
15. Антропов СЮ, Божко НС, Коростин СВ. Обеспечение достоверности измерений радиохимической чистоты радиофармацевтических препаратов методом сканирования тонкослойных хроматограмм. *Измерительная техника.* 2013;(10):60–5 [Antropov SYu, Bozhko NS, Korostin SV. Ensuring the accuracy on measurements of radiochemical purity of radiopharmaceuticals by scanning thin-layer chromatograms. *Izmeritel'naya tekhnika = Measurement Techniques.* 2013(10):60–5 (In Russ.)]
16. Божко НС, Антропов СЮ, Коростин СВ, Кодина ГЕ, Малышева АО. Оценка точности определения радиохимической чистоты радиофармпрепаратов с использованием сканера хроматограмм. *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* 2014;59(4):58–66 [Bozhko NS, Antropov SYu, Korostin SV, Kodina GE, Malysheva AO. Accuracy of measurements of radiochemical purity of radiopharmaceuticals with chromatogram scanner. *Meditsinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost' = Medical Radiology and Radiation Safety.* 2014;59(4):58–66 (In Russ.)]
17. Calmanovici GP, Salgueiro MJ, Leonardi NM, Goldman CG, Nicolini JO, Boccio JR, et al. Quality control validation for exogenous natural surfactant labeled with ^{99m}Tc. *J Nucl Med Technol.* 2005;33(4):234–7. PMID: 16322125
18. Seetharaman S, Ballinger JR, Sosabowski MH. Simplified method for determining the radiochemical purity of ^{99m}Tc-MAG3. *J Nucl Med Technol.* 2006;34(3):179–83. PMID: 16951288
19. Leonardi NM, Casale GA, Nicolini J, Zubata PD, Salgueiro MJ, Zubillaga MB. Validation of a paper chromatographic methodology as an alternative for determination of the radiochemical purity of Na¹⁸F. *J Nucl Med Technol.* 2012;40(4):271–4. <https://doi.org/10.2967/jnm.112.107664>
20. Straub M, Leresche M, Pilloud C, Devynck F, Stritt N, Hesselmann R. A new two-strip TLC method for the quality control of technetium-99m mercaptoacetyl triglycine (^{99m}Tc-MAG3). *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry.* 2018;3(5):1–16. <https://doi.org/10.1186/s41181-018-0040-5>
21. Santos R, Videira HS, Okamoto MRY, Guimarães MICC, Fonda US, Itikawa E, et al. Validation of the analytical method of chemical purity of ¹⁸F radiopharmaceutical fludeoxyglucose (FDG) via thin layer chromatography. *Int J Develop Res.* 2019;9(4):27005–10.
22. Wrzesien M. ¹⁸F-FDG production procedures as a source of eye lens exposure to radiation. *J Radiol Prot.* 2018;38(1):382–93. <https://doi.org/10.1088/1361-6498/aaa287>
23. Hakala JL, Hung JC, Mosman EA. Minimizing human error in radiopharmaceutical preparation and administration via a bar code-enhanced nuclear pharmacy management system. *J Nucl Med Technol.* 2012;40(3):183–6. <https://doi.org/10.2967/jnm.111.097105>
24. Strykowski J, Hadsall R, Sawchyn B, VanSickle S, Niznick D. Bar-code-assisted medication administration: a method for predicting repackaging resource needs. *Am J Health Syst Pharm.* 2013;70(2):154–62. <https://doi.org/10.2146/ajhp120200>
25. Samaranyake NR, Cheung ST, Cheng K, Lai K, Chui WC, Cheung BM. Implementing a bar-code assisted medication administration system: effects on the dispensing process and user perceptions. *Int J Med Inform.* 2014;83(6):450–8. <https://doi.org/10.1016/j.jmedinf.2014.03.001>

26. Elsinga P, Todde S, Penuelas I, Meyer G, Farstad B, Faivre-Chauvet A, et al. Guidance on current good radiopharmacy practice (cGRPP) for the small-scale preparation of radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37(5):1049–62. <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1407-3>
27. Aerts J, Ballinger JR, Behe M, Decristoforo C, Elsinga PH, Faivre-Chauvet A, et al. Guidance on current good radiopharmacy practice for the small-scale preparation of radiopharmaceuticals using automated modules: a European perspective. *J Labelled Comp Radiopharm*. 2014;57(10):615–20. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3227>
28. Todde S, Peitl PK, Elsinga P, Kozirowski J, Ferrari V, Ocak EM, et al. Guidance on validation and qualification of processes and operations involving radiopharmaceuticals. *EJNMMI Radiopharm Chem*. 2017;2:8. <https://doi.org/10.1186/s41181-017-0025-9>
29. Ballinger JR, Blower PJ. Radiochemical purity testing of ^{99m}Tc-labelled radiopharmaceuticals: how much is enough? *Nucl Med Commun*. 2011;32(9):761–3. <https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e3283488ce8>
30. Maioli C, Lucignani G, Strinchini A, Tagliabue L, Del Sole A. Quality control on radiochemical purity in Technetium-^{99m} radiopharmaceuticals labelling: three years of experience on 2280 procedures. *Acta Biomed*. 2017;88(1):49–56. <https://doi.org/10.23750/abm.v88i1.5285>
31. Kolenc PP, Rangger C, Garnuszek P, Mikolajczak R, Hubalewska-Dydejczyk A, Maina T, et al. Clinical translation of theranostic radiopharmaceuticals: Current regulatory status and recent examples. *J Labelled Comp Radiopharm*. 2019;62(10):673–83. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3712>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Кодина Галина Евгеньевна, канд. хим. наук, доцент. *Galina E. Kodina*, Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3415-4329>

Малышева Анна Олеговна. *Anna O. Malysheva*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9508-2840>

Статья поступила 21.08.2019

После доработки 16.09.2019

Принята к печати 19.11.2019

Article was received 21 August 2019

Revised 16 September 2019

Accepted for publication 19 November 2019

Регуляторные подходы к программе разработки лекарственных препаратов, применяемых для лечения инфекционных заболеваний

И. В. Лыскова*, О. И. Басова

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Резюме. Всемирная организация здравоохранения в феврале 2017 г. впервые опубликовала документ, содержащий перечень устойчивых к действию антибиотиков «приоритетных патогенов» — 12 видов бактерий, которые представляют наибольшую угрозу для здоровья человека. В документе подчеркивается опасность, которую представляют грамотрицательные бактерии, устойчивые к действию сразу нескольких антибиотиков. В связи с этим очевидна актуальность разработки новых антибактериальных препаратов, а данный документ призван стать ориентиром и стимулом для научных исследований и разработок в области создания новых антибиотиков, которые помогут в решении масштабной проблемы устойчивости к противомикробным препаратам. Цель работы — определение основных регуляторных подходов к планированию программы доклинических и клинических исследований новых антимикробных препаратов. На основании актуальных требований и рекомендаций, действующих в Российской Федерации, и руководств Европейского агентства по лекарственным средствам, рассмотрены вопросы планирования программ разработки антибактериальных препаратов. Проанализированы основные этапы и особенности проведения доклинических исследований лекарственных препаратов, применяемых для лечения инфекционных заболеваний (специфическая активность *in vitro* и *in vivo*, фармакокинетическое-фармакодинамическое моделирование). Рассмотрены требования, предъявляемые к этапу клинических исследований данной группы препаратов, включая обоснование выбора клинически значимых конечных точек оценки безопасности и эффективности, дизайна исследования, статистического расчета.

Ключевые слова: антибактериальные препараты; бактерии; доклинические исследования; клинические исследования; множественная лекарственная устойчивость; эффективность; безопасность

Для цитирования: Лыскова ИВ, Басова ОИ. Регуляторные подходы к программе разработки лекарственных препаратов, применяемых для лечения инфекционных заболеваний. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(4):231–240. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-231-240>

***Контактное лицо:** Лыскова Ирина Викторовна; Lysikova@expmed.ru

Regulatory Approaches to the Development Programme for Medicines Used to Treat Infectious Diseases

I. V. Lysikova*, O. I. Basova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract. In February 2017 the World Health Organization first published the list of antibiotic-resistant «priority pathogens» — a catalogue of 12 species of bacteria that pose the greatest threat to human health. The list highlights the danger posed by Gram-negative bacteria that are resistant to multiple antibiotics. Thus, the development of new antimicrobial medicines is becoming a pressing issue. The list is an important reference point and incentive to secure and guide research and development related to new antibiotics that will help solve the issue of growing global resistance to antimicrobial medicines. The aim of the study was to determine the main regulatory approaches to planning preclinical and clinical development programmes for new antimicrobial medicines. On the basis of current requirements and recommendations in force in the Russian Federation and guidelines of the European Medicines Agency, the issues of planning antimicrobial drug development programs were considered. The authors analysed the main stages and aspects of preclinical studies of medicines for infectious diseases (specific activity *in vitro* and *in vivo*, PK-PD modeling), as well as requirements for the clinical trial stage, including the rationale for the choice of clinically relevant efficacy and safety endpoints, study design, and statistical methods.

Key words: antimicrobial medicines; bacteria; preclinical studies; clinical studies; multiple drug resistance; efficacy; safety

For citation: Lysikova IV, Basova OI. Regulatory approaches to the development programme for medicines used to treat infectious diseases. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(4):231–240. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-231-240>

***Corresponding author:** Irina V. Lysikova; Lysikova@expmed.ru

Потребность в создании новых препаратов, обладающих противомикробной активностью, чрезвычайно велика, несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении инфекционных заболеваний. Инфекционные заболевания по-прежнему остаются угрозой для здоровья человека, являясь основной причиной смертности в развивающихся странах и серьезной проблемой для передовых стран [1]. Лекарственная устойчивость¹, в том числе множественная лекарственная устойчивость (multi-drug resistance, MDR), становится одной из основных проблем современной медицины [1–3]. Названные Всемирной организацией здравоохранения 12 видов бактерий разделены на три группы в зависимости от степени необходимости создания новых антибиотиков: «крайне приоритетные», «высокоприоритетные» и «среднеприоритетные». К крайне приоритетной группе относятся бактерии с MDR, которые представляют особенно серьезную опасность для пациентов больниц и лечебно-реабилитационных центров и пациентов, для лечения которых требуются медицинские устройства, такие как аппараты для искусственной вентиляции легких и венозные катетеры. В эту группу входят: *Acinetobacter baumannii* — устойчивы к карбапенемам; *Pseudomonas aeruginosa* — устойчивы к карбапенемам; *Enterobacteriaceae* — устойчивы к карбапенемам, вырабатывают бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), вызывающие тяжелые и часто смертельные инфекции, такие как инфекции кровотока и пневмонию. Во вторую группу входят: *Enterococcus faecium* — устойчивы к ванкомицину; *Staphylococcus aureus* — устойчивы к метициллину, умеренно чувствительны или устойчивы к ванкомицину; *Helicobacter pylori* — устойчивы к кларитромицину; *Campylobacter* spp. — устойчивы к фторхинолонам; *Salmonellae* — устойчивы к фторхинолонам; *Neisseria gonorrhoeae* — устойчивы к цефалоспорином, фторхинолонам. Среднеприоритетные: *Streptococcus pneumoniae* — не чувствительны к пенициллину; *Haemophilus influenzae* — устойчивы к ампициллину; *Shigella* spp. — устойчивы к фторхинолонам². При этом некоторые виды возбудителей, включая *Mycobacterium tuberculosis*, выделены в специальные программы.

Таким образом, очевидна актуальность разработки новых антимикробных препаратов. Для правильного планирования программы их разработки необходимо учитывать основные регуляторные подходы к доклиническим и клиническим исследованиям этой группы препаратов.

Цель работы — определение основных регуляторных подходов к планированию программы доклинических и клинических исследований новых антимикробных препаратов.

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ *IN VITRO* И *IN VIVO* ИССЛЕДОВАНИЯ И ВОПРОСЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ

(не включают оценку токсикологических свойств препарата)

Основными задачами этапа доклинической разработки новых антимикробных препаратов являются:

- выяснение механизма действия, определение спектра активности;
- определение типов инфекций, которые потенциально можно лечить с его помощью, и оценка распределения минимальных ингибирующих концентраций (МПК) для наиболее важных патогенов, имеющих отношение к заявленным показаниям³.

Значения МПК₅₀, МПК₉₀ и диапазон МПК должны быть представлены по видам и, при необходимости, по подгруппам (например, со специфическими механизмами устойчивости и без них), включая оценку возможного уровня лекарственной устойчивости. В некоторых случаях активность *in vitro* должна быть определена для клинических изолятов, полученных в течение пяти лет до подачи регистрационного досье. Для часто встречающихся патогенов необходимо протестировать несколько сотен изолятов каждого вида, в том числе с устойчивостью к известным классам антимикробных препаратов. Для редких патогенов/редко встречающихся механизмов резистентности или штаммов с MDR рекомендуется тестировать по крайней мере по 10 микроорганизмов каждого вида или с каждым механизмом резистентности и MDR. Необходимо отдельно оценивать *in vitro* противомикробную активность основных метаболитов, образующихся в организме человека⁴.

Механизм ингибирования для новых ингибиторов бета-лактамаз (ИБЛ) должен быть исследован с использованием широкого перечня бета-лактамаз. Необходимо подтвердить факт наличия собственной антибактериальной активности при клинически достижимых концентрациях в плазме у ИБЛ. Комбинация бета-лактамов (БЛ) и ингибиторов бета-лактамаз (БЛ/ИБЛ) должна быть протестирована на штаммах, устойчивых к одному БЛ, с использованием фиксированной концентрации ИБЛ или фиксированного соотношения БЛ и ИБЛ. Выбор метода тестирования должен обсуждаться с учетом фармакокинетического-фармакодинамического (ФК/ФД) индекса ИБЛ. При выборе режимов

¹ Кукес ВГ, ред. *Клиническая фармакология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015. [Kukes VG, ed. *Clinical pharmacology*. Moscow: GEOTAR-Media; 2015 (In Russ.)]

² World Health Organization. Available from: <https://www.who.int/ru/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

³ Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antimicrobial medicinal products (EMA/CHMP/594085/2015).

⁴ Guideline on the evaluation of medicinal products indicated for treatment of bacterial infections, Rev. 3 (EMA/844951/2018 Rev. 3).

дозирования для доклинических моделей инфекций следует учитывать обоснование предложенной методики тестирования чувствительности *in vitro* и аргументировать применимость метода к диапазону доз для клинического применения⁵.

Стандартными исследованиями являются: исследование активности по времени гибели микроорганизмов; оценка МПК при наличии ряда механизмов устойчивости; оценка внутриклеточной противомикробной активности для патогенов с преимущественно внутриклеточным распределением; оценка степени связывания исследуемого лекарственного средства (ЛС) с белками плазмы человека для клинически значимых концентраций, а также измерение общих или свободных концентраций антимикробного соединения в других жидкостях организма. МПК, используемые для анализа вероятности достижения целевых показателей (ВДЦП), обычно охватывают значения во всем наблюдаемом диапазоне и всегда должны включать значения в верхней части распределения МПК (МПК₉₀ и/или эпидемиологические предельные значения (ЭПЗ) для каждого интересующего вида патогенов)⁶.

ФК/ФД индекс. Для ЛС, обладающих активностью в отношении микроорганизмов, важнейшим показателем является ФК/ФД индекс, отражающий количественную взаимосвязь между величиной экспозиции исследуемого ЛС и микробиологической оценкой чувствительности патогена. Целевым показателем является такое значение ФК/ФД индекса, при котором достигается желаемый уровень прогнозируемого ответа. ФК/ФД индексы и их целевые показатели первоначально получают на этапе доклинических исследований, затем подтверждают/модифицируют их значения на основе данных клинических исследований (КИ)⁷.

В случае выявления в исследовании по времени гибели микроорганизмов зависимости противомикробной активности препарата от его концентрации основными для прогнозирования эффективности в ФК/ФД модельных системах являются отношения площади под фармакокинетической кривой (AUC_{0-24}) и/или максимальной концентрации в плазме (C_{max}) к МПК ($AUC_{0-24}/МПК$ и $C_{max}/МПК$). В случае выявления зависимости противомикробной активности препарата от времени воздействия основными параметрами оценки эффективности служат время на протяжении дозирования, в течение которого концентрация ЛС в плазме превышает МПК ($\%T > МПК$); отношение минимальной остаточной концентрации пре-

парата перед следующим введением дозы (C_{trough}) к МПК и/или отношение $AUC_{0-24}/МПК$ ⁸.

К специфическим доклиническим целевым ФК/ФД индексам относят: полный статический эффект, т.е. отсутствие снижения десятичного логарифма числа колониеобразующих единиц \log_{10} (КОЕ); снижение на единицу \log_{10} (КОЕ); снижение на две единицы \log_{10} (КОЕ). ФК/ФД индексы основываются на результатах доклинических исследований *in vivo* (животных моделях) и/или *in vitro*. Обычно тестируют 4–5 патогенов основных целевых родов или видов. Патогены, используемые в моделях, должны быть репрезентативны в отношении предполагаемого клинического применения, а также иметь значения МПК, перекрывающие значения верхнего диапазона для штаммов дикого типа. Большинство животных моделей — это модели на мышах. Дополнительные специализированные модели могут быть использованы в случаях менингита, внутриклеточных инфекций и таких микроорганизмов, как *M. tuberculosis* и *Listeria monocytogenes*⁹.

Популяционные фармакокинетические модели (ПФКМ) строятся для предсказания распределения исследуемого ЛС в организме человека и для последующего анализа взаимосвязи между экспозицией и ответом (В-О) в целевой популяции пациентов.

Резистентность. Патогены, для которых значения МПК необычайно высоки, должны быть изучены на предмет наличия механизмов резистентности. Для исследуемых ЛС нового класса в исследованиях чувствительности *in vitro* следует оценить вероятность возникновения перекрестной резистентности с лекарственными препаратами (ЛП) других классов. Рекомендуются, чтобы риск выработки устойчивости также оценивался в фармакодинамической модели *in vitro*¹⁰.

КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ

Клиническая фармакокинетика и ФК/ФД анализ. Фармакокинетические (ФК) данные, полученные у добровольцев/пациентов, имеют решающее значение для выбора потенциально эффективных схем дозирования. Определение целевых значений ФК/ФД индекса с последующей оценкой ВДЦП при помощи качественно выполненных симуляций на основе соответствующих ПФКМ может служить заменой поисковых КИ по подбору дозы, особенно в случае патогенов с MDR и/или редких инфекций. ПФКМ строятся по ФК данным здоровых добровольцев, у которых возможен интенсивный отбор проб после однократного или многократного

⁵ Guideline on the evaluation of medicinal products indicated for treatment of bacterial infections, Rev. 3 (EMA/844951/2018 Rev. 3).

⁶ Там же.

⁷ Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antimicrobial medicinal products (EMA/CHMP/594085/2015).

⁸ Там же.

⁹ Там же.

¹⁰ Guideline on the evaluation of medicinal products indicated for treatment of bacterial infections, Rev. 3 (EMA/844951/2018 Rev. 3).

приема исследуемого ЛС. При необходимости может быть оценено влияние почечной и/или печеночной недостаточности на фармакокинетику ЛС. Между здоровыми добровольцами и пациентами могут наблюдаться следующие важные различия: более высокая внутрииндивидуальная вариабельность ФК параметров у пациентов даже при отсутствии значительных изменений функции органов и/или изменений концентрации белка в плазме, выраженной влиянием различных клинических характеристик на значения ФК параметров¹¹.

Когда целевые значения ФК/ФД индексов идентифицированы на доклиническом этапе, необходимо оценить, применимы ли они к типичной популяции пациентов. Учитывая, что ФК данные пациентов на момент проведения симуляций могут отсутствовать или могут быть представлены в ограниченном количестве, применяют статистический подход для моделирования индивидуальных ФК профилей пациентов, для которых входные данные включают оценки средних значений для ФК параметров и дисперсии каждого из них. Общее число пациентов в модели должно быть рассчитано на основе вариабельности данных и сложности самой модели¹².

Определение вероятности достижения целевых показателей. Используя моделирование, можно оценить вероятность достижения целевых показателей ФК/ФД индексов, когда МПК исследуемого ЛС находится в пределах диапазона, наблюдаемого для основных патогенов, имеющих отношение к предполагаемому клиническому применению. Результаты моделирования должны быть представлены для каждого рода, вида или группы микроорганизмов:

- по выбранным значениям МПК исследуемого ЛС;
- по целевому ФК/ФД индексу, вызывающему прекращение размножения, по уничтожению патогенов на 1 или 2 единицы \log_{10} (КОЕ).

Для потенциально опасных для жизни инфекций (например, госпитальная пневмония, включая ИВЛ-ассоциированную) с низкой частотой самопроизвольного разрешения ожидается, что будет выбран целевой ФК/ФД индекс, при котором происходит снижение \log_{10} (КОЕ) как минимум на единицу. Однако, по возможности, следует проводить моделирование, при котором происходит снижение \log_{10} (КОЕ) на 2 единицы от исходного уровня. Для инфекций, связанных с более низкой нагрузкой на организм и/или при наличии возможности излечения с помощью противомикробной терапии в со-

четании с другими видами терапевтического вмешательства (например, использование хирургического вмешательства), может считаться достаточным целевой ФК/ФД индекс, характеризующий полный бактериальный стазис¹³.

В целях выявления потенциально эффективных схем дозирования с помощью МПК исследуемого ЛС в верхней части распределения патогена дико-го типа (например, включая МПК₉₀ и/или ЭПЗ) обычно ожидается, что предлагаемый режим дозирования обеспечивает ВДЦП > 90 % на основе выбранного целевого ФК/ФД индекса. Еще более высокая ВДЦП может считаться подходящей, если исследуемый ЛП предложен для лечения опасных для жизни инфекций, для которых эффективные ЛС уже доступны. ВДЦП < 90 % может быть приемлема в некоторых случаях: если известно, что доза, необходимая для достижения > 90 % ВДЦП, плохо переносится. В противном случае необходимо обоснование приемлемости ВДЦП < 90 % на основании таких фактов, как низкая степень тяжести данного заболевания или очень небольшое количество патогенов с МПК в верхней части диапазона¹⁴.

Анализ оценки клинического воздействия-ответа. Для обеспечения возможности последующего анализа показателя В-О следует выбрать схему отбора ФК проб, которая будет использоваться в КИ, для получения точных и правильных оценок ФК параметров. Анализ В-О может использоваться для описания взаимодействия между МПК исследуемого ЛС для патогена(ов), ФК параметрами и исходами лечения. Понимание взаимосвязи В-О помогает идентифицировать клинические ФК/ФД индексы и их целевые значения, что обеспечивает дополнительную поддержку в выборе адекватных схем дозирования, первоначально выбранных по значениям доклинических ФК/ФД индексов¹⁵.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ. ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ

Отбор пациентов в КИ. Пациенты могут быть включены в КИ эффективности и безопасности на основании клинических данных и результатов соответствующих диагностических и микробиологических исследований (микроскопия и/или микробиологический посев). Критерии включения/невключения должны устанавливать ограничение в продолжительности и/или количестве доз предшествующей антимикробной терапии¹⁶.

Определение дозового режима. КИ по подбору доз следует проводить для антимикробных препаратов

¹¹ Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antimicrobial medicinal products (EMA/CNMP/594085/2015).

¹² Там же.

¹³ Там же.

¹⁴ Там же.

¹⁵ Там же.

¹⁶ Guideline on the evaluation of medicinal products indicated for treatment of bacterial infections, Rev. 3 (EMA/844951/2018 Rev. 3).

несистемного действия (для местного применения, ингаляционные, внутрикишечные). В остальных случаях определение ФК/ФД индекса с последующей оценкой ВДЦП при помощи качественно выполненных симуляций на основе соответствующих ПФКМ может служить заменой поисковых КИ по определению дозы, особенно в случае патогенов с MDR и/или редких инфекций. Продолжительность курса терапии должна обосновываться фармакокинетикой исследуемого ЛС и имеющимися клиническими данными¹⁷.

В случае наличия лекарственных форм как для парентерального, так и для перорального введения можно предусмотреть перевод пациента на пероральное лечение после минимального курса внутривенного введения данного ЛС. Если ФК данные и ФК/ФД анализ указывают на то, что ВДЦП является достаточной и схожей между двумя путями введения, то результаты КИ, в которых предусмотрено два режима, могут служить основой для регистрации указанных лекарственных форм ЛС по исследуемому показанию(-ям). В некоторых случаях рекомендуется указать в протоколе КИ о запрете перехода на последующую пероральную терапию. Если такой переход осуществим, рекомендуется проводить парентеральную терапию исследуемым ЛС в течение не менее 5 сут независимо от типа инфекции¹⁸.

В протоколе могут быть указаны любые дополнительные ЛП, которые имеют спектр активности, не перекрывающийся или минимально перекрывающийся со спектром исследуемого ЛС. Если возникает необходимость добавить к схеме терапии ЛП перекрывающий спектр исследуемого ЛС, то его следует отдельно оценивать при другом типе инфекции, для которой монотерапия считается достаточной¹⁹.

В КИ с активным контролем, в которых сравнивают исследуемую схему БЛ/ИБЛ для доказательства преимущества от добавления ИБЛ, важно провести дополнительный анализ в подгруппе пациентов, инфицированных патогенами, продуцирующими бета-лактамазы, которые не чувствительны к БЛ, но чувствительны к БЛ/ИБЛ. Предполагается, что большая часть доказательной базы по схемам дозирования ИБЛ будет получена из ФК/ФД анализа.

Сбор образцов. Соответствующие образцы должны быть получены до начала лечения, через заранее определенные промежутки времени с момента рандомизации, но так, чтобы не превышать 24 ч до или 12 ч после первой назначенной дозы.

Посев и выделение культуры возбудителя следует проводить по возможности всегда. Если использование культурального метода вызывает затруднения, применяют другие тесты (например, серологические для *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp., *Chlamydomphila* spp.)²⁰.

Двойные слепые исследования. Предпочтительным дизайном КИ антимикробных препаратов является формат двойных слепых рандомизированных исследований. Если по техническим причинам не представляется возможным проведение КИ в указанном формате, то необходимо гарантировать, что врачи, которые производят оценку клинических результатов и сообщают о нежелательных явлениях (НЯ), не обладают информацией о назначенном пациенту лечении. Итоговую оценку исходов по всем популяциям должны проводить члены независимого комитета, которым также не должны быть доступны сведения о назначенных пациенту исследуемых препаратах²¹.

Прерывание назначенной терапии. В общем, не рекомендуется отмечать в протоколе возможность прерывания пациентами назначенной терапии, основываясь только на анализе микробиологической культуры и ее чувствительности к ЛС, в некоторых случаях (отсутствие улучшения, значительный риск для пациента) терапия может быть отменена²².

Оценка исходов. Длительность терапии, визит окончания терапии (ЕОТ), визит оценки излечения (ТОС) и время проведения остальных визитов, на которых должны оцениваться исходы лечения, следует выбирать в соответствии с типом исследуемой инфекции и ФК характеристиками исследуемого ЛС и активного контроля. Визит ТОС должен происходить в течение заранее определенного временного интервала после рандомизации. Желательно проводить дальнейшее наблюдение (1–2 недели после ТОС), особенно для видов инфекций, характеризующихся высокой частотой рецидивов²³.

Первичный анализ эффективности. В исследованиях, которые имеют клиническую первичную конечную точку, первичный анализ должен проводиться в популяции всех рандомизированных пациентов (intent-to-treat, ИТТ). В исследованиях, имеющих микробиологическую или комбинированную первичную конечную точку ответа на лечение, первичный анализ следует проводить в микробиологической ИТТ-популяции (mИТТ). Необходимо запланировать в протоколе анализ чувствительности полученных результатов к влиянию определенных

¹⁷ Guideline on the evaluation of medicinal products indicated for treatment of bacterial infections, Rev. 3 (EMA/844951/2018 Rev. 3).

¹⁸ Там же.

¹⁹ Там же.

²⁰ Там же.

²¹ Там же.

²² Там же.

²³ Там же.

факторов (отмена из-за неудачи лечения, развитие НЯ и серьезных НЯ, дополнительная антибактериальная терапия до визита ТОС, определенные вмешательства) на выводы исследования²⁴.

Вторичный анализ эффективности. Проводится для всех рандомизированных пациентов, которые получили, по крайней мере, одну дозу назначенного ЛС в заранее определенных популяциях и подгруппах, которые могут представлять интерес (клинические и микробиологические результаты на каждом визите; микробиологические результаты по патогенам; клинические и микробиологические результаты по подгруппам пациентов; анализ других конечных точек, таких как смертность от всех причин; и др.)²⁵.

Анализ случаев неудач. Отчеты о КИ должны включать комплексный анализ клинических неудач, целью которого является выяснение влияния в этих случаях индивидуальных характеристик пациента и/или сочетания факторов хозяина/патогена/течения заболевания. Любые обнаруженные факторы должны быть описаны и проанализированы, включая проведение В-О анализа²⁶.

ДИЗАЙН КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования не меньшей эффективности. Данный вид КИ приемлем в случае, когда существует зарегистрированный ЛП для лечения целевой инфекции в рамках КИ, для которого известна величина лечебного эффекта по сравнению с плацебо. При выборе границы не меньшей эффективности следует учитывать необходимость косвенной демонстрации превосходства исследуемого ЛС над отсутствием антибактериальной терапии и принимать во внимание клиническую значимость величины различий между исследуемым ЛП и контролем. Исторические данные могут использоваться для оценки эффекта отсутствия лечения, но применимость таких данных к проспективному рандомизированному исследованию, отражающему современную медицинскую практику, может быть сомнительной.

Собранные по данным европейского Руководства по оценке лекарственных средств, предназначенных для лечения бактериальных инфекций²⁷, примеры КИ не меньшей эффективности при терапии инфекций с определенной локализацией приведены в таблице 1.

Исследования превосходства. Демонстрация превосходства над плацебо или активным контролем требуется при отсутствии зарегистрированного ЛП сравнения или стандарта лечения для исследуемой инфекции, а также в случае, когда эффект лечения для любого зарегистрированного ЛП или стандарта

лечения неизвестен или считается сомнительным. Например, эффект лечения не был оценен в адекватно спланированном плацебо-контролируемом исследовании, которое соответствовало бы действующим клиническим стандартам. Демонстрация превосходства над плацебо возможна при самоограничивающихся инфекциях с короткой продолжительностью и низким риском осложнений.

Ниже перечислены требования к дизайну КИ превосходства для инфекций с определенной локализацией.

- **Острый бактериальный синусит:** рекомендуется проводить по крайней мере одно КИ в популяции пациентов с синуситом, диагностированным с помощью методов визуализации, с микробиологическим посевом образцов, полученных с помощью пункции. Первичный анализ должен проводиться у пациентов с релевантным исходным патогеном (mITT); за положительный исход принимается разрешение клинических признаков и симптомов на визите ТОС.

- **Бактериальные обострения хронического бронхита или бронхоэктатическая болезнь, не связанная с муковисцидозом:** у соответствующих критериям включения пациентов должно возникнуть обострение заболевания, требующее антибактериальной терапии. Первичный анализ должен проводиться на популяции ITT, первичный критерий эффективности — клинический успех. Клинический успех может быть определен как устранение признаков и симптомов обострения и/или возврат к исходному состоянию.

- **Инфекции кожи и мягких тканей:** в КИ ЛС, предназначенных для системного введения или местного применения на коже, как правило, ожидается демонстрация превосходства над плацебо. Отдельные КИ должны проводиться при определенных типах инфекции, таких как импетиго, инфекции поверхностных ран и инфицированные дерматозы. Кроме того, из-за различий в патогенезе и лечении различных дерматозов рекомендуется изучать эффекты исследуемых ЛС в отдельных КИ при таких состояниях, как инфицированный атопический дерматит и инфекционное обострение при псориазе. Первичный анализ должен проводиться в mITT; за положительный исход принимается исчезновение клинических признаков и симптомов на визите ТОС. Время до разрешения инфекции, которое можно оценить в конце курса лечения, может быть приемлемой первичной конечной точкой при лечении инфекций с высокой частотой самопроизвольного разрешения, таких как инфицированные поверхностные раны²⁸.

²⁴ Guideline on the evaluation of medicinal products indicated for treatment of bacterial infections, Rev. 3 (EMA/844951/2018 Rev. 3).

²⁵ Там же.

²⁶ Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antimicrobial medicinal products (EMA/CHMP/594085/2015).

²⁷ Guideline on the evaluation of medicinal products indicated for treatment of bacterial infections, Rev. 3 (EMA/844951/2018 Rev. 3).

²⁸ Там же.

Таблица 1. Требования к дизайну клинических исследований не меньшей эффективности для разных типов инфекций
Table 1. Requirements for non-inferiority study designs for different types of infections

Тип инфекции Type of infectious disease	Популяция пациентов, включенных в клинические исследования Patient selection criteria	Первичный анализ Primary analysis
<p>Острые бактериальные инфекции кожи и мягких тканей</p> <p>Acute bacterial skin and soft tissue infections</p>	<p>Критерии включения: целлюлит, рожистое воспаление, раневые инфекции (травматические или послеоперационные) и крупные абсцессы; необходимо указать минимальную площадь инфекционного очага или предполагаемый размер абсцесса. Доля пациентов с абсцессами должна быть ограничена ($\approx 30\%$), и в протоколе должен быть указан промежуток времени (например, 24–48 ч) с момента randomизации, в течение которого должен быть выполнен хирургический или чрескожный дренаж.</p> <p>Критерии не включения: пациенты с тяжелыми некротическими или инфекционными поражениями, остеомиелитом, септическим артритом.</p> <p>Требуется проведение отдельного КИ по показанию «диабетическая стопа».</p> <p>Inclusion Criteria: cellulitis, erysipelas, wound infections (traumatic or post-surgical), and major abscesses. The minimum affected area or the estimated size of the abscess should be specified.</p> <ul style="list-style-type: none"> - the proportion of patients with abscesses should be limited ($\approx 30\%$); - the protocol should define the time window (e.g. 24–48 h) after randomisation within which surgical or percutaneous drainage should be performed. <p>Exclusion Criteria: severe necrotising infections, osteomyelitis, septic arthritis. It is preferred that separate trials are conducted to support treatment of diabetic foot infections.</p>	<p>Клинический исход в популяции ИТТ на визите ТОС; граница не меньшей эффективности — 10 %.</p> <p>Clinical outcome in the ITT population at the TOC visit; using a non-inferiority margin of — 10 %.</p>
<p>Внебольничная пневмония</p> <p>Community-acquired pneumonia (CAP)</p>	<p>Критерии включения: наличие рентгенограммы грудной клетки, полученной в течение 48 ч до включения пациента в КИ, с наличием новых инфильтратов с долевым или мультидолевым расположением, проявление установленных протоколом характерных клинических симптомов (по крайней мере, трех-четыре): кашля, гнойной мокроты, одышки, тахипноэ, боли в груди, а также, по крайней мере, одна характерная находка при перкуссии и/или аускультации.</p> <p>Исходное состояние пациентов также может быть описано при помощи шкал (например, шкала CURB-65). Пациенты должны быть отнесены к определенному классу по шкале оценки исходов (шкала PORT). Если лечение начинается с внутривенного введения ЛП: минимальный балл по шкале PORT III, при этом 25 % пациентов с баллом >III по PORT. Приемлемо исключать пациентов с PORT V, которым требуется госпитализация в отделение интенсивной терапии.</p> <p>Если лечение начинается с перорального введения ЛП: минимальный балл по PORT II или III, при этом 50 % пациентов должны быть с баллом III по шкале PORT. Необходимо стратификация в зависимости от возраста <65 лет и ≥ 65 лет и от балла по шкале PORT.</p> <p>Критерии не включения: пневмония, вторичная по отношению к аспирации или специфической обструкции, муковисцидоз.</p> <p>Inclusion Criteria: a chest radiograph obtained within 48 hours prior to enrolment should show new infiltrates in a lobar or multilobar distribution. Patients should demonstrate a protocol-defined minimum number (e.g. at least 3–4) of distinct clinical symptoms: cough, purulent sputum, dyspnoea, tachypnoea, pleuritic chest pain, and at least one characteristic finding on percussion and/or auscultation. The baseline status of patients can also be described using scoring systems (e.g. CURB-65). Patients should be assigned to a specific class according to the outcome system (PORT system). When treatment is to be initiated by the intravenous route, eligible patients should have a minimum PORT score of III, and 25 % of patients should have a PORT score of >III. It may be appropriate to exclude patients with a PORT score of V who require immediate Intensive Unit Care admission. When treatment is to be initiated by the oral route, patients should have a minimum PORT score of II or III, and 50 % of patients should have a PORT score of III. Stratification of enrolment according to age <65 years and ≥ 65 years and PORT score is required.</p> <p>Exclusion Criteria: pneumonia that is secondary to aspiration or specific obstruction, cystic fibrosis.</p>	<p>Клинический исход в популяции ИТТ на визите ТОС; граница не меньшей эффективности — 10 %.</p> <p>Clinical outcome in the ITT population at the TOC visit; using a non-inferiority margin of — 10 %.</p>

Тип инфекции Type of infectious disease	Популяция пациентов, включенных в клинические исследования Patient selection criteria	Первичный анализ Primary analysis
<p>Госпитальная и ИВЛ-ассоциированная пневмония</p> <p>Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia (VAP)</p>	<p>Либо отдельные КИ по каждому показанию (причем доказательство эффективности при ИВЛ-ассоциированной пневмонии может переноситься на госпитальную пневмонию, но не наоборот) или КИ для двух нозологий, при этом около 30 % пациентов должны быть с диагнозом ИВЛ-ассоциированная пневмония.</p> <p>Критерии включения: пациенты с диагнозом госпитальной пневмонии должны иметь длительность госпитализации не менее 48 ч до появления первых симптомов или симптомов появляющихся в течение 7 сут после выписки. Минимальное количество характерных клинических симптомов аналогично внебольничной пневмонии плюс новый инфильтрат на рентгенограмме. Для пациентов с ИВЛ-ассоциированной пневмонией — нахождение на ИВЛ (через эндотрахеальную/назогастральную трубку) минимум 48 ч.</p> <p>Дополнительные критерии включения: баллы по шкале CPIS ~ 6, PaO₂ < 60 мм рт. ст., SaO₂ < 90 %, ↓ PaO₂/FiO₂. Могут использоваться ограничения и по другим шкалам: SOFA, MODS, APACHE II.</p> <p>Критерии исключения: пациенты, обследованные только в условиях неотложной помощи; пациенты, находящиеся только на вентиляции с положительным давлением без интубации.</p> <p>Studies may be confined to a particular type of pneumonia (a convincing demonstration of efficacy in VAP could support an indication that includes HAP but not vice versa), or include patients with either HAP or VAP (about 30 % of the patients should have VAP).</p> <p>Inclusion Criteria: patients with HAP should have been hospitalised for at least 48 hours before onset of the first signs or symptoms or these should occur within 7 days of hospital discharge. Patients should demonstrate a minimum number of clinical symptoms as suggested for CAP plus a new infiltrate on chest radiograph. Patients with VAP should have received mechanical ventilation via an endotracheal or nasotracheal tube for at least 48 hours. Additional inclusion criteria: CPIS of ~ 6, PaO₂ < 60 mm Hg, SaO₂ < 90 %, ↓ PaO₂/FiO₂ ratio. Other scoring systems may be applied, such as SOFA, MODS, APACHE II.</p> <p>Exclusion Criteria: patients who have only been assessed in an emergency care setting, patients receiving only positive pressure ventilation without intubation.</p>	<p>Клинический исход в популяции ИТТ на визите ТОС; граница не меньшей эффективности — 12,5 %.</p> <p>Clinical outcome in the ITT population at the TOC visit; using a non-inferiority margin of — 12.5 %.</p>
<p>Осложненная интраабдоминальная инфекция</p> <p>Complicated intra-abdominal infection</p>	<p>Критерии включения: осложненная интраабдоминальная инфекция, задокументированная во время проведения лапаротомии, лапароскопии или чрескожного дренижа. Примеры диагнозов: перфорация желчного пузыря, дивертикулита или аппендикса; вторичный посттравматический перитонит и абсцессы, связанные с любым из этих состояний. Доля пациентов с аппендицитом не должна превышать 50 %, и необходима стратификация по его наличию.</p> <p>Критерии исключения: перфорация желудка и тонкой кишки при условии отсутствия установленного вторичного инфекционного процесса в брюшной полости.</p> <p>Inclusion Criteria: complicated intra-abdominal infection established during laparotomy, laparoscopy or percutaneous drainage. Suitable diagnoses include: perforations of the gall bladder, a diverticulum or the appendix; established peritonitis secondary to trauma, and abscesses associated with any of these conditions. The proportion of patients with appendicitis should not exceed 50 % and patients should be stratified according to infection type.</p> <p>Exclusion Criteria: patients with perforations of the stomach and small intestine (unless there is evidence of an established secondary infectious process within the abdominal cavity).</p>	<p>Клинический исход в mITT на визите ТОС; граница не меньшей эффективности — 10 %.</p> <p>Clinical outcome in the microbiological-ITT population at the TOC visit; using a non-inferiority margin of — 10 %.</p>
<p>Осложненные инфекции мочевыводящих путей и острый пиелонефрит</p>	<p>Или отдельные КИ по каждому показанию, или одно КИ для двух нозологий, при этом как минимум 30 % от общего числа включенных пациентов должно быть по каждой из нозологий.</p> <p>Критерии включения: минимум одно из условий: постоянный уретеральный (не чрескожный) катетер, задержка мочи, obstructing мочевого пузыря путей, нейротгенный мочевого пузыря. Пиурия (≥ 10 лейкоцитов/мм³) в подводящих образцах свежей мочи или результаты микробиологического посева. Минимальное количество симптомов: боль в боку, боль в животе, боль в надлобковой области, дизурия, позывы к мочеиспусканию, учащенное мочеиспускание.</p> <p>Критерии исключения: пузырно-мочеточниковый рефлюкс, симптомы простатита, подвздошные петли.</p>	<p>Частота комбинированного клинического и микробиологического ответа, соответствующего критериям успешного исхода лечения (определяемого как < 10⁵ КОЕ/мл в моче, полученной на визите ТОС) в mITT популяции на визите ТОС; граница не меньшей эффективности — 10 %.</p> <p>Пациенты, составляющие mITT, должны иметь > 10⁵ КОЕ/мл одного или не более двух релевантных патогенов в исходном образце мочи. Патогены должны быть идентифицированы до уровня вида.</p>

Тип инфекции Type of infectious disease	Популяция пациентов, включенных в клинические исследования Patient selection criteria	Первичный анализ Primary analysis
Complicated urinary tract infections and acute pyelonephritis	Clinical trials may be confined to a particular infection or may cover two infections (at least 30 % of the patients enrolled should have either infection). Inclusion Criteria: patients should have at least one of the following: indwelling urethral (i.e. not percutaneous) catheter, urinary retention, urinary obstruction or neurogenic bladder. Enrollment should be based on documented pyuria (≥ 10 WBCs/mm ³) in suitable fresh urine samples, or microbiological culture results. Minimum number of symptoms: flank pain, abdominal pain, pubic pain, dysuria, urinary frequency or urgency. Exclusion Criteria: patients with ileal loops, vesico-ureteric reflux, and signs and symptoms suggesting prostatitis.	Combined clinical and microbiological success rate (defined as $< 1 \times 10^5$ CFU/mL in a urine sample collected during the TOC visit) in the microbiological-ITT population at the TOC visit; using a non-inferiority margin of — 10 %. Patients eligible for the mITT population should have $> 1 \times 10^5$ CFU/mL of one or, maximum, two relevant pathogens in the baseline urine sample. Pathogens should be identified at the species level.
Неосложненные инфекции мочевыводящих путей	Критерии включения: пациенты женского пола с острым циститом, у которых должны наблюдаться следующие симптомы: дизурия, учащенное мочеиспускание, позывы к мочеиспусканию вплоть до недержания мочи. Подтвержденная пиурия (≥ 10 лейкоцитов/мм ³) в образце свежей мочи, полученной на середине акта мочеиспускания, или результаты microbiологического посева.	Частота комбинированного клинического и microbiологического ответа, соответствующего критериям успешного исхода лечения (определяемого как $< 10^5$ КОЕ/мл в моче, полученной на визите ТОС) в mITT на визите ТОС; граница не меньшей эффективности — 10 %. Пациенты, составляющие mITT, должны иметь $> 10^5$ КОЕ/мл одного релевантного патогена в исходном образце мочи. Патогены должны быть идентифицированы до уровня вида. Combined clinical and microbiological success rate (defined as $< 1 \times 10^5$ CFU/mL in a urine sample collected during the TOC visit) in the microbiological-ITT population at the TOC visit; using a non-inferiority margin of — 10 %. Patients eligible for the mITT population should have $> 1 \times 10^5$ CFU/mL of one relevant pathogen in the baseline urine sample. Pathogens should be identified at the species level.
Uncomplicated urinary tract infections	Inclusion Criteria: female patients with acute cystitis should have a minimum number of symptoms, such as dysuria, urinary frequency and urgency verging on incontinence. Patients may be enrolled before microbiological culture results are available based on documented pyuria (≥ 10 WBCs/mm ³) in a mid-stream specimen of urine.	Микробиологическая эрадикация в mITT на визите ТОС; граница не меньшей эффективности — 10 %. Пациенты, составляющие mITT, должны иметь положительный результат обнаружения <i>Neisseria gonorrhoeae</i>. Microbiological eradication in the microbiological-ITT population at the TOC visit; using a non-inferiority margin of — 10 %. Patients eligible for the mITT population should have a positive culture result for <i>N. gonorrhoeae</i> .
Неосложненная гонорея	Критерии включения: признаки гонококкового цервицита или уретрита на основании обнаружения характерных грамотрицательных диплококков в уретральном или цервикальном отделяемом или мазках. Если в исследовании включены пациенты с симптомами ректальной или фарингеальной гонореи, отделение или в сочетании с уретральной или цервикальной инфекцией, рекомендуется проводить стратификацию по месту локализации инфекции при randomизации. Визит ТОС может проводиться в течение одной недели (например, 3–4 сут) после завершения лечения в целях максимального увеличения доли пациентов с подтвержденными случаями эрадикации возбудителя. Следует предусмотреть отсроченный по времени визит follow-up, чтобы зафиксировать случаи поздних рецидивов, реинфекций или новых случаев заражения другими патогенами. Inclusion Criteria: patients with evidence of gonococcal cervicitis or urethritis supported by characteristic Gram-negative diplococci found in urethral or cervical fluids or swabs.	Microbiological eradication in the microbiological-ITT population at the TOC visit; using a non-inferiority margin of — 10 %. Patients eligible for the mITT population should have a positive culture result for <i>N. gonorrhoeae</i> .
Uncomplicated gonorrhoea	If the study includes patients with symptoms of rectal or pharyngeal gonorrhoea — alone or in conjunction with urethral or cervical infection, the patients should be stratified during randomisation according to the site of infection. The TOC visit may be performed within one week (e.g. 3–4 days) after treatment to maximise the proportion of patients with documented eradication of the infection. A late follow-up visit should be planned to capture late relapses, re-infections or new infections.	Microbiological eradication in the microbiological-ITT population at the TOC visit; using a non-inferiority margin of — 10 %. Patients eligible for the mITT population should have a positive culture result for <i>N. gonorrhoeae</i> .

Примечание. КИ — клинические исследования; ИВЛ — искусственная вентиляция легких; ИТТ — популяция всех рандомизированных пациентов, для которых имеются данные microbiологических исследований; ТОС — визит оценки излечения; SOFA — балльная шкала оценки полиорганной недостаточности у пациентов с септическим синдромом; MODS — шкала оценки полиорганной дисфункции; APACHE II — шкала оценки острых физиологических расстройств и хронических нарушений состояния II; CPIS — клиническая шкала оценки инфекции легких; PaO₂ — парциальное давление кислорода в артериальной крови; SaO₂ — индекс сатурации; PaO₂/FiO₂ — индекс оксигенации; PORT — индекс тяжести пневмонии по шкале исследования исходов пневмонии; CURB-65 — шкала количественной оценки тяжести пневмонии; КОЕ — колониобразующая единица.
Note. VAP — ventilator-associated pneumonia; ITT — intention-to-treat population; mITT — microbiological ITT-population; TOC — test-of-cure visit; SOFA — Sepsis Organ Failure Assessment; MODS — Multiple Organ Dysfunction Score; APACHE II — Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; CPIS — Clinical Pulmonary Infection Score; PaO₂ — partial pressure of oxygen in the arterial blood; SaO₂ — oxygen saturation; PaO₂/FiO₂ — oxygenation index; PORT — Pneumonia Outcomes Research Team; CURB-65 — Confusion, Urea, Respiratory rate, Blood; CFU — colony-forming unit.

Такие первичные точки эффективности, как клиническое излечение или смертность, приняты регуляторными органами во всем мире, но, несмотря на это, имеют ряд недостатков. Например, субъективность в оценке показателя «клиническое излечение» за счет различий в его определении, особенно в отношении тяжелобольных пациентов, проявления симптомов у которых могут быть связаны с другими интеркуррентными заболеваниями; требование большого размера выборки для показателя «общая смертность», лишь частично связанного непосредственно с самим инфекционным процессом. В результате дизайны КИ создаются с учетом возможных затруднений с оценкой конечных точек, что приводит к тому, что спонсоры исключают пациентов с высоким риском смерти, сужая популяцию узко заданными критериями включения. Учитывая, что предполагаемое показание к применению исследуемого препарата охватывает не в последнюю очередь именно таких пациентов, указанные КИ не отвечают концепции «pragmatic clinical trial», предполагающей максимальное соответствие клинической действительности. Это довольно критично, учитывая, что существует общемировая потребность именно в новых антимикробных препаратах для лечения тяжело протекающих инфекций и инфекций с MDR. Помимо этого, в случае разработки антимикробных препаратов с новым механизмом действия требуются иные подходы к оценке их эффективности и безопасности. Например, в случае ЛП, воздействующих на человеческий микробиом, усиливающих иммунный ответ, потенцирующих действие давно используемых в клинической практике препаратов. При клинической разработке подобных инновационных препаратов (бактериофагов, опсонизирующих моноклональных антител, систем адресной доставки, антибактериальных пептидов, полученных из дефензинов насекомых, и т.д.), спонсоры сталкиваются с различными про-

блемами: отсутствием подходящих валидированных животных моделей, неприменимостью МПК, затруднениями с выбором популяции для КИ, необходимостью расширенного доказательства безопасности и доказательства эффективности с гипотезой превосходства. Поэтому в настоящее время на первый план выходят расширенные доклинические исследования и математическое моделирование на ранних фазах [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, чтобы стимулировать проведение КИ новых противомикробных препаратов, обеим сторонам диалога — представителям фармацевтической отрасли и регуляторным органам — необходимо принимать во внимание современные подходы к программе доклинических и клинических исследований данных ЛС. Необходимо, учитывая проблему множественной лекарственной устойчивости патогенов, четко планировать исследования как на этапах изучения специфической активности нового препарата в условиях *in vitro* и *in vivo* и фармакокинетического-фармакодинамического моделирования, так и при выборе дизайна исследования и клинически значимых конечных точек оценки безопасности и эффективности.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Shallcross LJ, Davies SC. The World Health Assembly resolution on antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(11):2883–5. <https://doi.org/10.1093/jac/dku346>
2. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
3. Решетько ОВ, Якимова ЮН. Инновационные антибиотики для системного применения. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2015;17(4):272–85. [Reshetko OV, Yakimova YuN. New systemic antimicrobials. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2015;17(4):272–85 (In Russ.)]
4. Asín-Prieto E, Rodríguez-Gascón A, Isla A. Applications of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents. *J Infect Chemother.* 2015;21(5):319–29. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.02.001>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Лысикова Ирина Викторовна, канд. мед. наук. *Irina V. Lysikova*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7032-5957>
Басова Ольга Игоревна. *Olga I. Basova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6300-2092>

Статья поступила 28.03.2019
После доработки 27.06.2019
Принята к печати 19.11.2019

Article was received 28 March 2019
Revised 27 June 2019
Accepted for publication 19 November 2019

Взаимозаменяемость препаратов на основе эссенциальных фосфолипидов

Н. Д. Бунятян^{1,2}, Б. Б. Сысуюев^{2,*}, Л. Л. Николаева^{2,3}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Первый Московский государственный
медицинский университет им. И. М. Сеченова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 111999, Российская Федерация

³Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Каширское ш., д. 24, Москва, 115478, Российская Федерация

Резюме. Значительная доля фармацевтического рынка гепатопротекторов представлена референтными и воспроизведенными препаратами, содержащими эссенциальные фосфолипиды (ЭФ). Одним из основных вопросов фармако-терапии является доказательство идентичности референтного и воспроизведенного препаратов для оценки их взаимозаменяемости, поэтому представляется актуальным проведение сравнительных исследований состава препаратов (содержания действующих и вспомогательных веществ), лекарственной формы и способов введения для выявления показателей, влияющих на взаимозаменяемость препаратов на основе ЭФ. Цель работы — анализ взаимозаменяемости воспроизведенных и референтных гепатопротекторов, содержащих ЭФ. В обзоре представлена номенклатура ЭФ (формы для приема внутрь (капсулы), парентерального введения (раствор для внутривенного введения и лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения) и местного применения (гель для наружного применения)) в соответствии с данными Государственного реестра лекарственных средств, поисково-информационных и библиотечных баз данных (eLibrary, PubMed, CyberLeninka, ResearchGate). Выявлены значительные различия содержания фосфатидилхолина (29–93 %) в субстанциях фосфолипидов различных производителей, установлены несущественные различия в количественном составе вспомогательных веществ в растворах и значительные отличия в составе и количественном содержании вспомогательных веществ в капсулах, что может быть связано с различной технологией производства. Представленные данные могут быть использованы для оптимизации фармацевтической разработки и оценки взаимозаменяемости лекарственных препаратов ЭФ.

Ключевые слова: эссенциальные фосфолипиды; воспроизведенные препараты; референтные препараты; взаимозаменяемость; вспомогательные вещества

Для цитирования: Бунятян НД, Сысуюев ББ, Николаева ЛЛ. Взаимозаменяемость препаратов на основе эссенциальных фосфолипидов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(4):241–247. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-241-247>

***Контактное лицо:** Сысуюев Борис Борисович; bsb500@yandex.ru

Interchangeability of Essential Phospholipid Products

N. D. Bunyatyan^{1,2}, B. B. Sysuev^{2,*}, L. L. Nikolaeva^{2,3}

¹Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University,
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

³N. N. Blokhin National Cancer Research Centre,
24 Kashirskoe Highway, Moscow 115478, Russian Federation

Abstract. A significant share of the hepatoprotectors pharmaceutical market is represented by innovator and generic products containing essential phospholipids. One of the main issues in pharmacotherapy is confirmation of similarity between reference and generic products, which helps to assess their interchangeability. Therefore, it seems relevant to conduct comparative studies examining the products' formulations (content of active pharmaceutical ingredients and excipients), dosage forms and routes of administration to identify characteristics that can affect interchangeability of essential phospholipid products. The objective of the study was to analyse interchangeability of generic and reference hepatoprotectors containing essential phospholipids. The nomenclature of essential phospholipids (oral (capsules), parenteral (solution for intravenous infusion and lyophilisate for solution for intravenous infusion), and topical (gel for cutaneous use) dosage forms) is given in accordance with the State Register of Medicinal Products, information storage and retrieval systems, and library databases (eLibrary, PubMed, CyberLeninka, ResearchGate).

There was a significant difference in the content of phosphatidylcholine (29–93 %) in phospholipid substances produced by different manufacturers; minor differences were found in the quantitative composition of excipients in solutions, and significant differences were observed in the composition and quantities of excipients in capsules, which is most likely attributed to different production methods. The obtained data may be used to optimise pharmaceutical development and assess interchangeability of essential phospholipid products.

Key words: essential phospholipids; generic products; reference products; interchangeability; excipients

For citation: Bunyatyan ND, Sysuev BB, Nikolaeva LL. Interchangeability of essential phospholipid products. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(4):241–247. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-241-247>

*Corresponding author: Boris B. Sysuev; bsb500@yandex.ru

На фармацевтическом рынке представлен широкий спектр лекарственных препаратов и БАД, применяемых для лечения и профилактики заболеваний печени. В 2012–2013 гг. 47 % рынка гепатопротекторов в натуральном выражении и более половины в стоимостном выражении составляли продукты, содержащие эссенциальные фосфолипиды (ЭФ) [1].

Эссенциальные фосфолипиды — широко известные гепатопротекторы, которые за годы применения хорошо зарекомендовали себя в терапии хронического гепатита, псориаза, лучевой болезни, цирроза и других видов поражения печени, хотя их клиническая эффективность не доказана. Наиболее ярким представителем лекарственных препаратов эссенциальных фосфолипидов, широко известным среди специалистов и пациентов, является препарат Эссенциале® форте Н, который оказался эффективен для лечения неалкогольного стеатогепатита, успешно применялся при терапии вирусных гепатитов В, С и D и при лечении больных печеночной энцефалопатией [2].

Эссенциальные фосфолипиды представляют собой высокоочищенный экстракт из семян сои культурной и в основном состоят из полиненасыщенного фосфатидилхолина [3]. Минимальная физиологическая норма потребления ЭФ в сутки включает 3000–6000 мг лецитина и 500–1000 мг холина. Фосфолипиды как структурные элементы клеточных мембран и органелл стимулируют процесс клеточной дифференцировки, пролиферации и регенерации, трансформируют холестерин в легко метаболизируемую форму, снижают агрегацию тромбоцитов и эритроцитов и воздействуют на иммунологические реакции [4]. Широкий диапазон печеночных функций и возможность их восстановления связаны со способностью производить новые клеточные мембраны, которые состоят в среднем на 65 % из фосфатидилхолина. Это наглядно доказывает важность фосфатидилхолина как структурообразующего вещества, незаменимого для оптимальной функции печени.

Естественным источником лецитина и холина является жирная пища с высокой концентрацией холестерина. Однако в связи с профилактикой различных заболеваний печени (гепатиты, цирроз, образование желчных камней и др.) все больше при-

обретает популярность гипохолестериновая диета, в результате чего резко снижается количество лецитина и холина, попадающего в организм с пищей [5]. В связи с этим для поддержания нормального функционирования печени рекомендуется принимать лекарственные препараты, содержащие ЭФ.

На российском фармацевтическом рынке представлено множество лекарственных препаратов, содержащих ЭФ, однако их клиническая эффективность и фармакологическая (гепатопротекторная) активность оцениваются неоднозначно.

В настоящее время наметилась устойчивая тенденция к применению воспроизведенных препаратов, так как их использование сокращает финансовые затраты и одновременно обеспечивает высокое качество лечения [6]. Одним из основных вопросов рациональной фармакотерапии является доказательство идентичности референтного и воспроизведенного лекарственных препаратов с целью оценки взаимозаменяемости. Положениями Федерального закона Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» взаимозаменяемый лекарственный препарат определяется как препарат с доказанной терапевтической эквивалентностью или биоэквивалентностью в отношении референтного лекарственного препарата, имеющего эквивалентные ему качественный состав и количественный состав действующих веществ, состав вспомогательных веществ, лекарственную форму и способ введения.

Цель работы — анализ взаимозаменяемости воспроизведенных и референтных гепатопротекторов, содержащих эссенциальные фосфолипиды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ номенклатуры лекарственных препаратов, содержащих ЭФ, проводился с использованием поисково-информационных и библиотечных баз данных (eLibrary, PubMed, CyberLeninka, ResearchGate), а также информации Государственного реестра лекарственных средств и сайта «Регистр лекарственных средств» (<https://www.rlsnet.ru/>).

Взаимозаменяемость препаратов оценивалась путем сравнения качественных и количественных характеристик фармацевтических субстанций действующего и вспомогательных веществ, лекарственной формы и пути введения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Современная номенклатура препаратов на основе ЭФ представлена формами для перорального (капсулы), парентерального (раствор для внутривенного введения и лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения) и местного применения (гель) (табл. 1).

ЭФ выпускаются как в виде индивидуальных препаратов с одним действующим веществом, так и в комбинированных препаратах (с витаминами, глицирризиновой кислотой, метионином, экстрактом плодов расторопши пятнистой, эсцином и гепарином натрия) (табл. 1); комбинация глицирризиновая кислота + фосфолипиды в виде капсул и лиофилизата включена в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств.

Глицирризиновая кислота, метионин и силимарин, входящие в состав расторопши, повышают гепатопротекторные свойства эссенциальных фосфолипидов. Кроме выраженного гепатопротекторного действия глицирризиновая кислота и ее соли потенцируют действие эндогенных глюкокортикоидов, тем самым оказывая противовоспалительный эффект при неинфекционных поражениях печени [7].

Метионин — незаменимая аминокислота, обладающая свойством отдавать метильную группу, что определяет ее липотропный эффект. Проведен ряд исследований по сравнению действия монотерапии ЭФ с комбинированной терапией метиони-

ном и ЭФ у пациентов молодого возраста с хроническим поражением печени. При комбинированной терапии быстрее наблюдалась нормализация клинических параметров, фиксировалась положительная динамика показателей цитолитической ферментативной активности и липидного спектра крови, ускорение восстановления структуры печени и положительное влияние на прогрессирование фиброза печени [8].

В отличие от капсул и парентеральных форм ЭФ, которые являются гепатопротекторами, гель для наружного применения за счет присутствия в его составе гепарина и эсцина проявляет венотонизирующий эффект, при этом ЭФ снижают вязкость крови и агрегацию тромбоцитов.

Для подтверждения взаимозаменяемости препаратов ЭФ необходимо учитывать не только степень и идентичность активного вещества, но и состав препарата в целом. Как правило, основное отличие в составе референтного и воспроизведенного препаратов заключается в количественном содержании вспомогательных веществ, а также в различии физико-химических свойств субстанций действующего и вспомогательных веществ, поступающих от разных производителей. Фосфолипидный состав фосфатидилхолина зависит от источника получения и технологии производства.

Согласно Государственному реестру лекарственных средств, субстанцию фосфолипида для всех лекарственных препаратов, содержащих ЭФ, как референтных, так и воспроизведенных, производят

Таблица 1. Номенклатура лекарственных препаратов эссенциальных фосфолипидов

Table 1. The nomenclature of essential phospholipid products

Форма выпуска Dosage form	Международное непатентованное наименование International non-proprietary name	Торговое наименование Trade name	Компания производитель или обладатель регистрационного удостоверения Manufacturer or marketing authorisation holder
Капсулы Capsules	Фосфолипиды Phospholipids	Эссенциале® форте Н <i>референтный</i> Essentiale® forte N <i>reference drug</i>	«А. Наттерманн энд Сие ГмбХ» (Германия) A. Nattermann & Cie GmbH (Germany)
		Антралив® Antraliv®	ОАО «Нижфарм» (Россия) Nizhpharm OJSC (Russia)
		Лексум® Форте Lexum® Forte	ЗАО «КОРАЛ-МЕД» (Россия) Coral-Med CJSC (Russia)
		Ливолайф® Форте Livolife® forte	ЗАО «КОРАЛ-МЕД» (Россия) Coral-Med CJSC (Russia)
		Резалют® Про Rezolut® pro	«Берлин-Хеми/Менарини Фарма ГмбХ» (Германия) Berlin-Chemie AG/Menarini Pharma GmbH (Germany)
		Эссенциальные фосфолипиды Essential phospholipids	ООО «Атолл» (Россия) Atoll Ltd (Russia); ООО «Озон Фарм» (Россия) Ozon Pharm Ltd (Russia)
		Эссиал форте Essial forte	ООО «Атолл» (Россия) Atoll Ltd (Russia); ООО «Озон Фарм» (Россия) Ozon Pharm Ltd (Russia)

Продолжение таблицы 1

Форма выпуска Dosage form	Международное непатентованное наименование International non-proprietary name	Торговое наименование Trade name	Компания производитель или обладатель регистрационного удостоверения Manufacturer or marketing authorisation holder
Капсулы Capsules	Поливитамины + фосфолипиды Multivitamins + phospholipids	Хепабос® Hepabos®	Босналек АО (Босния и Герцеговина) Bosnalijek JSC (Bosnia and Herzegovina)
		Эссливер® Форте Essliver® Forte	ОАО «Нижфарм» (Россия) Nizhpharm OJSC (Russia)
	Глицирризиновая кислота + фосфолипиды Glycyrrhizic acid + phospholipids	Фосфоглив® референтный Phosphogliv® reference drug	ОАО «Фармстандарт-Лексредства» (Россия) Pharmstandard-Leksredstva OJSC (Russia)
		Эссенциглив Essentigliv	АО «Фармстандарт» (Россия) Pharmstandard JSC (Russia); Производственное республиканское унитарное предприятие «Минскинтеркапс» (Беларусь) Minskintercaps (Belarus)
		Фосфоглив® форте референтный Phosphogliv® forte reference drug	ОАО «Фармстандарт-Лексредства» (Россия) Pharmstandard-Leksredstva OJSC (Russia)
		Эслидин® референтный Eslidine® reference drug	ОАО «Нижфарм» (Россия) Nizhpharm OJSC (Russia)
Расторопши пятнистой плодов экстракт + фосфолипиды Milk thistle fruit extract + phospholipids	Фосфонциале® референтный Phosphonciale® reference drug	ЗАО «Канонфарма продакшн» (Россия) Canonpharma production CJSC (Russia); ООО «Бактэр» (Россия) Bacter Ltd (Russia)	
Раствор для внутривенного введения Intravenous solution	Фосфолипиды Phospholipids	Эссенциале® Н референтный Essentiale® N reference drug	ЗАО «Авентис Фарма» (Россия) Aventis Pharma CJSC (Russia); АО «Санofi Россия» (Россия) Sanofi Russia JSC (Russia)
		Ливенциале Liventsiale	«Роутек Лимитед» (Великобритания) Rowtech Ltd (UK)
		Л'эсфаль L'esfal	АО «Фармак» (Украина) Farmak JSC (Ukraine)
		Фосфонциале® Моно Phosphonciale® Mono	ООО «Бактэр» (Россия) Bacter Ltd (Russia)
		Эссенциальные фосфолипиды Essential phospholipids	ЗАО «Бинергия» (Россия) Binergia JSC (Russia)
		Эссливер Essliver	«Наброс Фарма Пвт. Лтд» (Индия) Nabros Pharma Pvt. Ltd (India)
Лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения Lyophilisate for solution for intravenous infusion	Глицирризиновая кислота + фосфолипиды Glycyrrhizic acid + phospholipids	Фосфоглив® референтный Phosphogliv® reference drug	ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА» (Россия) Pharmstandard-UfaVITA OJSC (Russia)
Гель для наружного применения Gel for cutaneous use	Гепарин натрия + фосфолипиды + эсцин Heparin sodium + phospholipids + escin	Детрагель® референтный Detragel® reference drug	АО «Сервье» (Россия) Servier JSC; АО «Босналек» (Босния и Герцеговина) Bosnalijek JSC (Bosnia and Herzegovina)
		Венабос® референтный Venabos® reference drug	АО «Сервье» (Россия) Servier JSC; АО «Босналек» (Босния и Герцеговина) Bosnalijek JSC (Bosnia and Herzegovina)

три компании: «Липоид ГмбХ» (Германия), «Фосфолипид ГмбХ» (Германия) и «Наброс Фарма Пвт. Лтд» (Индия), основное отличие субстанций заключается в различном содержании фосфатидилхолина (29–93 %) и, следовательно, в различных эмульгирующих свойствах и способности веществ включаться в метаболические процессы. В ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» проводили сравнительную оценку высвобождения жирных кислот из нескольких препаратов (Фосфоглив®, Эссенциале® форте Н и Эссливер® Форте) [9]. Наиболее активно липолиз проходил у препарата Фосфоглив, чуть меньшая активность наблюдалась в случае Эссенциале® форте Н, и с наименьшей интенсивностью липолиз протекал у Эссливер® Форте. Эссливер® Форте имеет наименьшее содержание фосфатидилхолина — 29 %, кроме того витамины, содержащиеся в нем, частично лимитируют действие фосфолипида. Высокая интенсивность липолиза указывает на то, что действующие вещества Фосфоглива интенсивнее включаются в метаболические процессы организма [2]. Высокое содержание фосфатидилхолина у субстанции Фосфолипид ГмбХ производства «Липоид ГмбХ» (Германия) указывает на глубокую очистку от примесей. Фосфатидилхолин имеет двухполярный заряд своей гидрофильной группы, в отличие от него некоторые примеси имеют отрицательный заряд или вовсе не имеют заряда при нейтральных значениях рН. Их структурное различие приводит к различию в гидратации гидрофильных частей их молекул. В некоторых работах упомянуто, что «минорные» примеси фосфатидилхолина, особенно лизофосфолипиды, способны влиять на стабильность эмульсий и в ряде случаев могут вызывать нежелательные лекарственные явления [2]. Это указывает на необходимость контроля содержания фосфатидилхолина в субстанции фосфолипида для подтверждения возможности взаимозаменяемости.

Глицерризиновую кислоту импортируют из Китая («Юли Канти Джинксинг Ликорайс Продактс Ко. Лтд»), Японии («Альпс Фармасьютикал Индастри Ко. Лтд») и США («Мафко Вордлвайд Корпорейшн»), последняя компания также поставляет натрия глицерризинат, входящий в состав препарата Фосфоглив® форте. Витамины в составе препаратов Эссливер® Форте и Хепабос® производятся в Индии и Китае. В отличие от остальных веществ метионин и экстракт расторопши пятнистой производятся российскими компаниями ООО «Полисинтез», ОАО «Марбиофарм», ЗАО «Самаралектравы» и ООО НПО «ФармВИЛАР».

Базовый перечень вспомогательных веществ, входящих в состав зарегистрированных препаратов ЭФ, представлен 15 наименованиями для капсул и 6 — для растворов (табл. 2).

Согласно данным, приведенным в таблице 2, различия в количественном составе растворов не-

существенны, исключение представляет препарат Эссенциальные фосфолипиды, в который добавлен в незначительном количестве дополнительный компонент — 96 %-ный этанол. Состав капсул сильно варьирует, скорее всего, это связано с различной технологией производства. Так, например, сушку при выпуске Резалют® Про в отличие от других препаратов проводят не активным кислородом, являющимся мощным окислителем, а жидким азотом, что позволяет избежать образования потенциально опасных гидроперекисей [5]. Судя по количественному содержанию, основными вспомогательными веществами в референтных капсулах являются жир, соевое бобовое масло, микрокристаллическая целлюлоза и кальций карбонат, которые обладают пленкообразующими, пролонгирующими и эмульгирующими свойствами, в воспроизведенных препаратах для достижения этих свойств использовались глицерола моно/диалконат (С14–С18), воск и подсолнечное масло.

Несмотря на то что вспомогательные вещества в воспроизведенных препаратах обладают необходимыми качествами, существенное различие в их составе и отсутствие данных о проведении исследований по фармацевтической эквивалентности у этих препаратов требует проведения сравнительного анализа результатов доклинических и клинических исследований для подтверждения взаимозаменяемости. Так, терапевтическая эквивалентность препаратов Фосфоглив® и Эссенциглив изучалась на базах ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова» Минздрава России и ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора в открытом сравнительном рандомизированном клиническом исследовании эффективности и безопасности и доказана результатами терапии неалкогольного стеатогепатита [7].

Сроки годности и условия хранения референтных и воспроизведенных препаратов существенно не различаются. Капсулы Эссенциале® форте Н хранят при температуре не выше 21 °С, срок хранения составляет 2,5–3 года и зависит от материала блистера. Его взаимозаменяемые препараты (Антралив®, Лексум® Форте, Ливолайф® Форте, Резалют® Про) хранят 2 года при температуре не выше 20–25 °С. Эслиал форте и референтные препараты Фосфоглив®, Фосфоглив® форте хранят 3 года при температуре не выше 25 °С, Эссенциглив, Эслидин® и Фосфонциале® хранят 2 года при температуре не выше 25 °С.

Растворы выпускают в ампулах по 5 мл, срок хранения при температуре 2–8 °С составляет 3 года, за исключением препарата Л'эсфаль, выпускаемого ПАО «Фармак» (Украина), его срок годности составляет 2 года. Гели выпускают в тубах, хранят при температуре не выше 25 °С в течение 2 лет.

Таблица 2. Содержание вспомогательных веществ в референтных и воспроизведенных гепатопротекторах, содержащих эссенциальные фосфолипиды

Table 2. The content of excipients in the reference and generic hepatoprotectors containing essential phospholipids

Вспомогательное вещество Excipient	Содержание в референтных препаратах, мг Content in reference drugs, mg	Содержание в воспроизведенных препаратах, мг Content in generic drugs, mg
Капсулы / Capsules		
Жир твердый Solid fat	57	–
Соевых бобов масло Soybean oil	36	138,5–200
Масло касторовое гидрированное Hydrogenated castor oil	1,6	–
Этанол 96 % Ethanol 96 %	8,1	4–12
Этилванилин Ethyl vanillin	1,5	–
4-метоксиацетофенон 4-methoxyacetophenone	0,8	–
α-токоферол α-tocopherol	0,75	1
Микрокристаллическая целлюлоза Microcrystalline cellulose	141,2	–
Кальция карбонат Calcium carbonate	204,7	–
Кальция стеарат Calcium stearate	0,9	–
Тальк Talc	7,7	–
Кремния диоксид коллоидный (аэросил) Colloidal silicon dioxide (aerosil)	5,5	–
Бутилгидрокситолуол Butylhydroxytoluene	–	0,1
Глицерола моно/диалконат (C14–C18) Glycerol mono/dialconate (C14–C18)	–	120
Воск пчелиный Beeswax	–	36
Подсолнечника масло Sunflower oil	–	22,9–314
Раствор для внутривенного введения / Intravenous solution		
Бензиловый спирт Benzyl alcohol	45	45
Дезоксихолевая кислота Deoxycholic acid	126,5	115–126,5
Натрия хлорид Sodium chloride	12	11,8–12
Натрия гидроксид Sodium hydroxide	13,4	12–14,3 (до pH 7,5–9,5)
Рибофлавин Riboflavin	0,5	0,5
Этанол 96 % Ethanol 96%	–	3,3

Примечание. Без учета веществ, входящих в корпус и крышку капсулы.

Note. Not including substances that are contained in the capsule body and cap.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препараты на основе эссенциальных фосфолипидов выпускаются в виде капсул, растворов для внутривенного введения, лиофилизатов и гелей. Значительное различие в содержании фосфатидилхолина в субстанции фосфолипидов разных производителей указывает на невозможность отнесения некоторых препаратов к взаимозаменяемым (так, содержание фосфатидилхолина в Эссенциале® форте Н составляет 93 %, а у Эссливер® Форте только 29 %). При оценке состава вспомогательных веществ выявлены значительные различия в качественном и количественном содержании вспомогательных веществ. Отсутствие данных о проведении исследований фармацевтической эквивалентности и существенное различие в составе вспомогательных веществ указывает на необходимость проведения сравнительного анализа результатов доклинических и клинических исследований для установления взаимозаменяемости препаратов.

Представленные данные, касающиеся специфики субстанции фосфолипидов различных производителей и различий состава референтных и воспроизведенных препаратов на основе эссенциальных фосфолипидов, в дальнейшем могут быть использованы для оптимизации процесса разработки и оценки взаимозаменяемости лекарственных препаратов данной группы.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Сидорова И. Рынок лекарственных препаратов и БАД на основе эссенциальных фосфолипидов. *Ремедиум*. 2014;(4):32–3. [Sidорова I. Market of drugs and dietary supplements based on essential phospholipids. *Remedium = Remedium*. 2014;(4):32–3 (In Russ.)]
2. Гуревич КГ. Какие фосфолипиды «эссенциальнее»? *Клиническая фармакокинетика*. 2004;(1):52–7. [Gurevich KG. What phospholipids are «more essential»? *Klinicheskaya farmakokinetika = Clinical Pharmacokinetics*. 2004;(1):52–7 (In Russ.)]
3. Степанов ЮМ. Применение эссенциальных фосфолипидов для лечения жировой болезни печени. *Гастроэнтерология*. 2016;(4):58–64. [Stepanov YuM. The use of essential phospholipids for the treatment of fatty liver disease. *Gastroenterologiya = Gastroenterology*. 2016;(4):58–64 (In Russ.)] <https://doi.org/10.22141/2308-2097.4.62.2016.81089>
4. Гундерманн К-Й. Эссенциальные фосфолипиды в лечении жирового гепатоза. *Доктор.Ру*. 2016;(10):42–5. [Gundermann K-J. Role of essential phospholipids in treating fatty liver disease. *Doktor.Ru = Doctor.Ru*. 2016;(10):42–5 (In Russ.)]
5. Успенский ЮП. Эссенциальные фосфолипиды: старые природные субстанции — новые технологии производства лекарственных препаратов. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2009;(5):24–8. [Uspenskiy YuP. Essential phospholipids: old physical substances — new production technology. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2009;(5):24–8 (In Russ.)]
6. Орлова ОЛ, Полозкова АП, Оборотова НА, Шпрах ЗС, Киселева МП, Борисова ЛМ и др. Создание лабораторной технологии воспроизведенной лекарственной формы эпирубицина. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(4):72–7. [Orlova OL, Polozkova AP, Oborotova NA, Shprakh ZS, Kiseleva MP, Borisova LM, et al. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotechnology*. 2016;15(4):72–7 (In Russ.)] <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2016-15-4-72-77>
7. Силивончик НН. Комбинированные препараты эссенциальных фосфолипидов и глицирризинатов в лечении неалкогольной жировой болезни печени. *Здравоохранение*. 2015;(10):51–7. [Silivonchik NN. Essential phospholipid and glycyrrhizinate combined drugs for managing non-alcoholic fatty liver disease. *Zdravookhranenie = Healthcare*. 2015;(10):51–7 (In Russ.)]
8. Вялов СС. Клинико-патфизиологические аспекты гепатопротективной терапии у лиц молодого возраста. *Доктор.Ру*. 2011;(5):42–8. [Vyalov SS. Clinical and pathophysiological concepts of hepatoprotective therapy in young patients. *Doktor.Ru = Doctor.Ru*. 2011;(5):42–8 (In Russ.)]
9. Есауленко ЕЕ, Сторожук АП, Попков ВЛ, Курзанов АН, Самойлик НИ. Метаболическая доступность ряда липофильных продуктов растительного происхождения и препаратов на основе эссенциальных фосфолипидов. *Современные проблемы науки и образования*. 2014;(6). [Esaulenko EE, Storozhuk AP, Popkov VL, Kurzanov AN, Samoilik NI. Metabolic availability of several lipophilic products of plant origin and pharmaceuticals based on the essential phospholipids. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*. 2014;(6) (In Russ.)] <https://www.science-education.ru/pdf/2014/6/967.pdf>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Бунятян Наталья Дмитриевна, д-р фарм. наук, проф. *Natalia D. Bunyatyan*, Dr. Sci. (Pharm.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0936-5551>

Сысыев Борис Борисович, д-р фарм. наук, доцент. *Boris B. Sysuev*, Dr. Sci. (Pharm.), Associate Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9933-1808>

Николаева Людмила Леонидовна, канд. фарм. наук. *Ludmila L. Nikolaeva*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8003-8241>

Статья поступила 18.02.2019

После доработки 10.06.2019

Принята к печати 19.11.2019

Article was received 18 February 2019

Revised 10 June 2019

Accepted for publication 19 November 2019

Стандарты качества доклинических фармакологических исследований

Г. Н. Енгальчева*, Р. Д. Сюбаев, Д. В. Горячев

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Резюме. Качество и результативность доклинических исследований лекарственных средств гарантируются соблюдением правил надлежащей лабораторной практики (НЛП). Вместе с тем данные Всемирной организации здравоохранения и анализ нормативно-правовой базы свидетельствуют о том, что в настоящее время весьма актуальными проблемами разработки лекарственных средств являются достоверность и воспроизводимость результатов базовых биомедицинских исследований. Вследствие поискового характера исследований, связанных с подтверждением научных гипотез, и разнообразия используемых методологических подходов отсутствует возможность рационального применения жестких критериев НЛП для всех видов фармакологических исследований. Согласно международным актам, правила НЛП имеют статус требований и регламентируют качество доклинических исследований безопасности лекарственных средств в хорошо стандартизованных батареях тестов токсикологических исследований и исследований фармакологической безопасности, но не распространяются на исследования первичной фармакодинамики, определяющей потенциальную терапевтическую эффективность лекарственного средства. Зарубежные регуляторные органы рекомендуют нормировать фармакологические исследования на основе принципов НЛП также и при изучении вторичной фармакодинамики, особенно в том случае, если данный вид исследований вносит важный вклад в оценку безопасности препарата. Исследования фармакологической активности лекарственных средств, имеющие решающее значение в оценке перспективности кандидата на доклиническом этапе разработки лекарственного препарата, как правило, представляют собой «нерегулируемые исследования», результаты которых могут оказаться некорректными. В работе рассмотрена система регламентации фармакологических исследований, включающая организационные принципы их планирования и проведения, изложенные в рекомендациях по качественной практике базовых биомедицинских исследований. Применение этих принципов позволит обеспечить достоверность и воспроизводимость результатов доклинических фармакологических исследований и повысить их научную и практическую ценность при разработке новых лекарственных средств.

Ключевые слова: лекарственные средства; базовые биомедицинские исследования; доклинические исследования; первичная фармакодинамика; вторичная фармакодинамика; фармакологическая безопасность; качественная практика доклинических исследований

Для цитирования: Енгальчева ГН, Сюбаев РД, Горячев ДВ. Стандарты качества доклинических фармакологических исследований. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(4):248–255. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-248-255>

***Контактное лицо:** Енгальчева Галина Нинелевна; Engalycheva@expmed.ru

Quality Standards of Preclinical Pharmacological Studies

G. N. Engalycheva*, R. D. Syubaev, D. V. Goryachev

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract. The quality and effectiveness of preclinical trials of medicines depend on compliance with the Good Laboratory Practice (GLP) principles. At the same time, the data of the World Health Organisation (WHO) and the analysis of the regulatory framework suggest that the reliability and reproducibility of the results of basic biomedical research are currently a very urgent problem in medicine development. Due to the exploratory nature of studies related to confirmation of scientific hypotheses, and the variety of methodological approaches used, strict GLP criteria cannot be applied to all types of pharmacological studies. According to international acts, GLP principles have the status of requirements and regulate the quality of preclinical safety studies as represented by well-standardised «batteries of tests» used in toxicological studies and safety pharmacology studies, but they do not apply to studies of primary pharmacodynamics which determine potential therapeutic efficacy of the medicinal product. Foreign regulators recommend applying GLP principles to secondary pharmacodynamics studies as well, especially if this type of research makes an important contribution to the safety assessment of medicines. Thus, studies of pharmacological activity of medicines, which are crucial in assessing the prospects of the candidate medicine at the preclinical stage, are mostly «unregulated studies», the results of which may be incorrect. The article discusses the system of regulation of pharmacological studies, including principles of planning and implementation of these studies, as set out in recommendations on Quality Practice in Basic Biomedical Research (QPBR). The application of QPBR principles ensures reliability and reproducibility of the results of preclinical pharmacological studies and increases their scientific and practical value in the development of new medicines.

Key words: medicines; basic biomedical research; preclinical research; primary pharmacodynamics; secondary pharmacodynamics; safety pharmacology; quality practice in preclinical research

For citation: Engalycheva GN, Syubaev RD, Goryachev DV. Quality standards of preclinical pharmacological studies. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(4):248–255. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-248-255>

***Corresponding author:** Galina N. Engalycheva; Engalycheva@expmed.ru

Принципы надлежащей лабораторной практики (НЛП) — это система обеспечения качества, имеющая отношение к процессам организации, планирования, к порядку проведения и контроля неклинических исследований в области охраны здоровья человека и безопасности окружающей среды, а также оформления, архивирования и представления результатов этих исследований¹. Главная задача НЛП состоит в обеспечении возможности полного прослеживания и восстановления всего хода исследования. Правила НЛП имеют статус требований и регламентируют качество доклинических исследований, прежде всего безопасности лекарственных средств. Вследствие поискового характера исследований, связанных с подтверждением научных гипотез, и разнообразия используемых методологических подходов отсутствует возможность рационального применения жестких критериев НЛП на всех этапах доклинического фармакологического изучения лекарственного средства.

Цель работы — анализ действующей нормативно-правовой и методической базы доклинических фармакологических исследований и возможностей использования стандартов ВОЗ по обеспечению качества базовых биомедицинских исследований для проведения нерегулируемых фармакологических исследований лекарственного препарата.

НОРМАТИВНО-ПРАВОВАЯ БАЗА РЕГЛАМЕНТАЦИИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В соответствии со ст. 10 Федерального закона Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», «разработка лекарственных средств включает в себя поиск новых фармакологически активных веществ, последующее изучение их лекарственных свойств, доклинические исследования, разработку технологий производства фармацевтических субстанций, разработку составов и технологий производства лекарственных препаратов». Статьей 11 предусматривается регламентация доклинических исследований: «Доклиническое исследование лекарственного средства для медицинского применения проводится путем применения научных методов оценок в целях получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного средства... в соответствии с правилами надлежащей лабораторной

практики, утвержденными уполномоченным федеральным органом исполнительной власти»². Правила надлежащей лабораторной практики в России «разработаны с учетом национальной специфики и в то же время являются гармонизированными относительно Правил НЛП Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)³, Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР)⁴ и Евразийского экономического союза (ЕАЭС), имеющих наднациональное регулирование» [1]. В целях проведения в государствах — членах ЕАЭС доклинических (неклинических) исследований безопасности лекарственных средств и (или) веществ, содержащихся в лекарственных препаратах, решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 утверждены «Правила надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» (далее — Правила НЛП ЕАЭС), которые дополняют Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» [2]. Правила НЛП ЕАЭС определяют «надлежащую лабораторную практику (правила лабораторной практики)» как систему «требований к организации, планированию и проведению доклинических (неклинических) исследований веществ (лекарственных средств), оформлению результатов и контролю качества указанных исследований»⁵. «Неклиническое исследование безопасности для здоровья человека и окружающей среды» определяется как «опыт или серия опытов, в которых исследуемое вещество проходит проверку в лабораторных условиях или окружающей среде с целью получения данных о его свойствах и (или) безопасности, направляемых в уполномоченные органы»⁶. Приложение № 7 к Правилам НЛП ЕАЭС определяет общие требования к порядку проведения доклинических (неклинических) исследований лекарственных средств. Так, их целью является получение научными методами вне организма человека результатов оценки и доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственных средств. Указаны направления, по которым проводятся доклинические исследования лекарственных средств: изучение фармакологии и фармакокинетики лекарственного средства, токсикологические исследования⁷ (табл. 1).

¹ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 28.12.2012 г. № 2603-р «Об утверждении Национальной программы реализации принципов надлежащей лабораторной практики Организации экономического сотрудничества и развития в деятельности российских испытательных центров (лабораторий) в области неклинических лабораторных исследований объектов, содержащихся в пестицидах, косметической продукции, лекарственных средствах для медицинского применения, лекарственных средствах для ветеринарного применения, пищевых и кормовых добавках, а также в химических веществах промышленного назначения».

² Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

³ Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development. WHO; 2019. <https://www.who.int/tdr/publications/documents/glp-handbook.pdf?ua=1>

⁴ OECD series on principles of good laboratory practice (GLP) and compliance monitoring. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm>

⁵ Правила надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств, утвержденные Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81.

⁶ Там же.

⁷ Там же.

Таблица 1. Направления и задачи доклинического (неклинического) изучения лекарственных средств

Table 1. Areas and objectives of preclinical (nonclinical) studies of medicines

Направление исследований Area of research	Виды исследований Types of research
Изучение фармакологии лекарственного средства Pharmacological studies of medicines	Первичная и вторичная фармакодинамика, фармакология безопасности, фармакология лекарственного взаимодействия Primary and secondary pharmacodynamics, safety pharmacology, drug interaction pharmacology
Изучение фармакокинетики лекарственного средства Pharmacokinetic studies of medicines	Абсорбция, распределение, метаболизм, выведение, фармакокинетическое лекарственное взаимодействие, иные исследования фармакокинетики Absorption, distribution, metabolism, excretion, pharmacokinetic drug interaction, other pharmacokinetic studies
Токсикологические исследования Toxicological studies	Токсичность при однократном и повторном введениях лекарственного средства, генотоксичность, канцерогенность, репродуктивная токсичность, эмбриотоксичность, местная переносимость, иные исследования токсичности Single and repeated dose toxicity, genotoxicity, carcinogenicity, reproductive toxicity, embryotoxicity, local tolerance, other toxicity studies

В Приложении № 7 к Правилам НЛП ЕАЭС указано, что с соблюдением данных правил проводится изучение безопасности лекарственных средств⁸. Это согласуется со сложившейся международной практикой, согласно которой проведение экспериментальных фармакологических исследований в соответствии с правилами НЛП не является строго обязательным [3]. Таким образом, имеется большой пласт доклинических фармакологических исследований, которые не регулируются правилами НЛП и в литературе обозначаются как «нерегулируемые исследования» (non-regulated research) [4].

РЕГЛАМЕНТАЦИЯ КАЧЕСТВА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

После принятия Международным советом по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения руководства S7A по изучению фармакологической безопасности используется современная регуляторная классификация фармакодинамических исследований⁹. Согласно этой классификации фармакологические исследования подразделяются на изучение первичной и вторичной фармакодинамики и фармакологической безопасности. Первичные фармакодинамические исследования проводят для изучения механизма действия и эффектов действующего вещества в отношении целевой терапевтической мишени; вторичные — для изучения механизма действия и эффектов вещества, не связанных с его целевой терапевтической мишенью; исследования фармакологической безопасности — для оценки потенциальных нежелательных фармакодинамических эффектов

активного действующего вещества в дозах, соответствующих терапевтическому диапазону и выше.

Изучение фармакологической безопасности подразделяется на обязательные, последующие (уточняющие) и дополнительные исследования¹⁰. В первую очередь необходимо изучить влияние препарата на жизненно важные системы организма: сердечно-сосудистую, дыхательную и центральную нервную. Это так называемая основная батарея тестов, которые, согласно современным требованиям, должны быть проведены до первого применения препарата у человека¹¹. При выявлении каких-либо негативных фактов проводят последующие (уточняющие) исследования с целью углубленного изучения данных эффектов. Предметом дополнительных исследований фармакологической безопасности является изучение влияния препарата на органы и системы, функция которых может быть временно нарушена без причинения непоправимого вреда организму. Из вышеизложенного следует, что изучение фармакологической безопасности является неотъемлемой частью доклинической оценки безопасности новых лекарственных препаратов, поэтому данный вид исследования должен соответствовать принципам НЛП¹².

Вторичная фармакодинамика — это результат относительной избирательности действия лекарственных средств, которая характеризует их способность воздействовать на чувствительные мишени, не связанные с реализацией терапевтического фармакологического эффекта. Воздействие лекарственных средств на эти дополнительные мишени приводит к развитию вторичных побочных эффектов,

⁸ Правила надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств, утвержденные Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81.

⁹ Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals (S7A). ICH Harmonised tripartite guideline. 2000. <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html>

¹⁰ Там же.

¹¹ Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2013.

¹² Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals (S7A). ICH Harmonised tripartite guideline. 2000. <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html>

Таблица 2. Стандарты качества фармакодинамических исследований

Table 2. Quality standards of pharmacodynamic studies

Вид исследований Type of research	Задачи Objectives	Стандарт Requirements
Первичная фармакодинамика Primary pharmacodynamics	Изучение механизма действия и эффектов действующего вещества в отношении его целевой терапевтической мишени Study of the mechanism of action and effects of the active substance on the therapeutic target	Не определен Not defined
Вторичная фармакодинамика Secondary pharmacodynamics	Изучение механизма действия и эффектов вещества, не связанных с его целевой терапевтической мишенью Study of the mechanism of action and effects of the active substance that are not related to the therapeutic target	НЛП* GLP*
Фармакологические исследования безопасности Safety pharmacology studies	Исследования, направленные на изучение потенциальных нежелательных фармакодинамических эффектов активного действующего вещества со стороны физиологических функций в дозах, соответствующих терапевтическому диапазону и выше Studies that investigate potential adverse pharmacodynamic effects of the active substance on the physiological functions at doses within the therapeutic range and higher	НЛП GLP

Примечание. НЛП — правила надлежащей лабораторной практики (как национального, так и международного уровня).

Note. GLP — the principles of Good Laboratory Practice (at both national and international levels)

* Изучение вторичной фармакодинамики рекомендуется проводить в соответствии с НЛП, особенно в том случае, если данный вид исследований вносит важный вклад в оценку безопасности препарата.

*Secondary pharmacodynamic studies should follow GLP principles especially if this type of research makes a pivotal contribution to the safety evaluation of the medicinal product.

которые могут быть полезными, вредными или нейтральными. В общем виде исследования вторичной фармакодинамики могут включать как скрининговые исследования по определению вторичных мишеней связывания *in vitro*, так и основные тесты и модели специфической фармакологической активности *in vivo*. Изучение вторичной фармакодинамики рекомендуется проводить в соответствии с принципами НЛП, особенно в том случае, если данный вид исследований вносит важный вклад в оценку безопасности препарата¹³. Представители зарубежных регуляторных органов занимают мягкую позицию по вопросу регламентации этих исследований, однако, если доклинические исследования вторичной фармакодинамики для оценки безопасности проведены не в соответствии с принципами НЛП, не гарантировано, что их результаты будут безоговорочно приняты [3].

Таким образом, согласно руководству S7A, единственным видом фармакологических исследований, которые не регламентируются правилами НЛП, являются исследования первичной фармакодинамики¹⁴ (табл. 2).

Регуляторная классификация определяет первичную фармакодинамику как изучение механизма действия и эффектов действующего вещества в отношении его целевой терапевтической мишени. Исследования первичной фармакодинамики составляют основу доклинического подтверждения потенциальной эффективности по заявленным по-

казаниям, особенности действия или ожидаемых преимуществ перед существующими аналогами препарата по действию. Вследствие значительного разнообразия видов и механизмов специфического фармакологического действия и методологических подходов к их изучению отсутствует возможность универсальной регламентации фундаментальных исследований, в том числе исследований первичной фармакодинамики новых лекарственных средств. По этой причине система НЛП, регламентирующая условия жестко стандартизированных исследований безопасности, не может гарантировать достоверность и воспроизводимость разнородных фармакологических исследований лекарственных средств.

Необходимо отметить, что в последнее время широко обсуждается проблема низкой воспроизводимости результатов фармакологических исследований на ранних этапах разработки лекарственных препаратов. Так, исследователи компании «Amgen» не смогли воспроизвести результаты 47 из 53 опубликованных исследований в области онкологии и в том числе таргетной терапии, ученые компании «Baye» не подтвердили результаты 43 из 67 экспериментальных работ в области сердечно-сосудистых и онкологических исследований [5]. Это очень высокий процент невоспроизводимости, даже с учетом присущей биологическим системам вариабельности, которая может многократно усиливаться в случае определенных патологий, например раковых опухолей [6]. Эмпирические

¹³ Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals (S7A). ICH Harmonised tripartite guideline. 2000. <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html>

¹⁴ Там же.

Таблица 3. Этапы базовых биомедицинских исследований

Table 3. Stages of basic biomedical research

Этап Stage	Задачи Objectives	Методы Methods
1a	Выявить перспективный препарат To identify a possible new drug candidate Установить целесообразность его дальнейшей разработки To establish the feasibility of its further development	Аналитические Analytical Скрининговые Screening
1b	Охарактеризовать активное соединение To characterise the active pharmaceutical ingredient Доказать возможности его синтеза и анализа To investigate how to produce and analyse it Продолжить целенаправленные эксперименты по изучению его активности To continue focused biological experimentation to investigate its actions	Фармакологические <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> Pharmacological <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> Аналитические Analytical Химические Chemical
1c	Доказательство фармакологической активности нового лекарственного средства To demonstrate pharmacological activity of the new drug Подтверждение целесообразности его практического применения до начала дорогостоящих регулируемых стадий разработки To substantiate its applicability before time and resources are invested in the formal, regulated stages of drug development	Фармакологические Pharmacological Рецепторное связывание Receptor binding Модели патологии Pathology models Фармакокинетические Pharmacokinetic

оценки доклинических исследований выявили, что при их проведении использовали некорректные контроли, неверные статистические тесты, качество реагентов не тестировалось, для публикации исследователи выбирали наилучший результат, а не суммировали полный набор данных [6]. Резюмируя пять статей, опубликованных в 2014 году в журнале «Lancet», можно сделать вывод, что 85 % процентов финансирования биомедицинских исследований тратится на работы, которые плохо продуманы, ненадлежащим образом выполнены, проанализированы и представлены [7].

КАЧЕСТВЕННАЯ ПРАКТИКА БАЗОВЫХ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (QUALITY PRACTICES IN BASIC BIOMEDICAL RESEARCH – QPBR)

Эксперты ВОЗ указывают на существующую потребность в качественной практике проведения фундаментальных исследований, как в области разработки новых лекарств, так и на ранних этапах исследований в других областях здравоохранения¹⁵. Не вызывает сомнений, что отбор активных кандидатов для дальнейшей разработки лекарственного препарата или выбор новых стратегий профилактики и лечения заболеваний должен основываться на достоверных экспериментальных данных, которые могут быть получены только на основе научно обоснованных и тщательно контролируемых исследований. Для решения этой проблемы в 2006 году ВОЗ было издано руководство «Качественная практика базовых биомедицинских исследований»¹⁶. Данное руководство содержит методические ре-

комендации, описывает механизмы для практического управления исследовательским процессом. В том же 2006 году Британская ассоциация по обеспечению качества исследований (British Association of Research Quality Assurance, BARQA) разработала «Руководство по качеству для нерегулируемых исследований»¹⁷. На основании этих документов в 2012 году Отдел пищевых продуктов, лекарственных препаратов и косметических средств (Food, Drug and Cosmetics Division, FD&C) Американского общества по качеству (American Society for Quality, ASQ) опубликовал доклад «Лучшие качественные практики биомедицинских исследований в области разработки лекарственных средств» («Best quality practices for biomedical research in drug development»), в котором была рассмотрена потребность в единых стандартах для данной области научных исследований. Целевая аудитория данного доклада — научные сотрудники учреждений и компаний, занимающихся разработкой лекарственных средств [8].

Наиболее доступным является руководство QPBR, подготовленное ВОЗ, которое, в отличие от правил НЛП, носит рекомендательный характер. Данное руководство содержит методические рекомендации, описывает механизмы для практического управления исследовательским процессом, но не рассматривает вопросы научной составляющей проводимого исследования. Учитывая успех руководства QPBR и высокую потребность в обучении заинтересованных сторон надлежащей практике проведения базовых биомедицинских исследований, ВОЗ было принято решение разработать

¹⁵ Quality practices in basic biomedical research. Handbook. Geneva: WHO/TDR; 2006. <http://www.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/handbook-quality-practices-biomedical-research/en/>

¹⁶ Там же.

¹⁷ Guidelines for quality in non-regulated research. Suffolk: BARQA Publications; 2006.

Таблица 4. Основные признаки качественно проведенного исследования

Table 4. The main features of quality research

Характеристики исследования Study characteristics	Результаты Results
<p>Исследование надлежащим образом: спланировано, проведено, проконтролировано, записано, проверено, надлежащим образом составлен отчет The research is properly: planned, conducted, monitored, recorded, checked, reported</p>	<p>Релевантные, достоверные, воспроизводимые, этичные, верифицируемые, являются общественным достоянием Relevant, reliable and reproducible, ethical, auditable, in the public domain</p>

стандартизованные учебные пособия для преподавателей¹⁸ и для слушателей¹⁹.

Этапы базовых биомедицинских исследований²⁰ при разработке лекарственных средств, на которых необходимо решить определенную задачу, иллюстрирует таблица 3.

Ценность результатов фармакологических исследований базируется на двух важных аспектах: фундаментальной научной гипотезе, которая лежит в основе разработки лекарственного препарата, и практическом (экспериментальном) ее подтверждении. QPBR не распространяется на определение

научной ценности гипотезы, однако ее подтверждение возможно лишь в том случае, если гипотеза была доказана результатами качественно проведенных исследований. Необходимо обеспечить качественное проведение экспериментов начиная с первых этапов научной разработки лекарственного средства. В таблице 4 представлены основные признаки качественно проведенного исследования.

I.M. Presot с соавт. в своей работе [9] представили основные параметры качества фармакологических исследований, которые нормируются руководством QPBR (рис. 1).

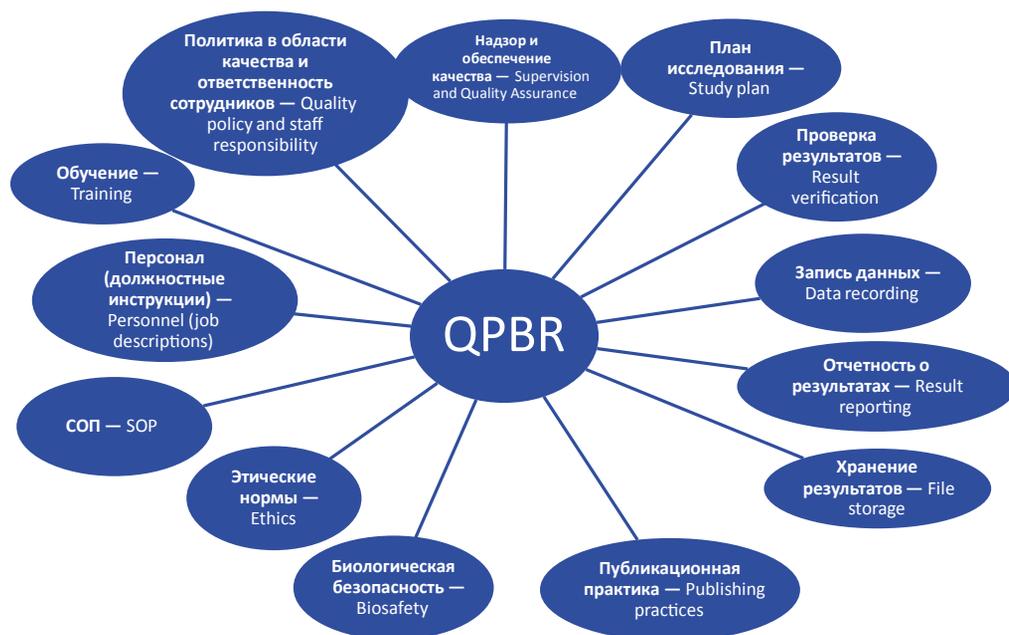


Рис. 1. Аспекты качества, регулируемые руководством по качественной практике базовых биомедицинских исследований [9]

Fig. 1. Quality parameters evaluated according to the Handbook of quality practices in basic biomedical research [9]

¹⁸ Quality practices in basic biomedical research (QPBR). Training manual for the trainer. Geneva: WHO/TDR; 2010.

<http://www.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/qpbr-trainer-manual-2010/en/>

¹⁹ Quality practices in basic biomedical research (QPBR). Training manual for the trainee. Geneva: WHO/TDR; 2010.

<http://www.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/qpbr-trainee-manual-2010/en/>

²⁰ Quality Practices in Basic Biomedical Research. Handbook. Geneva: WHO/TDR; 2006.

<http://www.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/handbook-quality-practices-biomedical-research/en/>

Система QPBR предусматривает надлежащую организацию исследования:

- тщательное планирование;
- проведение в соответствии с планом;
- полную и однозначную регистрацию первичных данных;
- отчетность с точным описанием первичных данных и фактических событий, зафиксированных при проведении исследования;
- хранение/архивирование всех записей и документов до их возможной публикации.

В части планирования исследований QPBR рассматривает исследовательское предложение, т.е. проект исследовательской программы, который утверждается руководством исследовательской организации и включает: научное обоснование исследования, цели исследования и конкретные задачи исследования (с планами отдельных исследований).

Исследовательское предложение может быть выдвинуто членами научного коллектива или же поступить от возможного заказчика исследований. Для успешной реализации исследовательской программы может потребоваться проведение нескольких исследований. Каждое отдельное исследование должно быть предметом одного плана: одно исследование = один план исследования.

В учреждении, проводящем базовые биомедицинские исследования в соответствии с QPBR, необходимо иметь руководства по подготовке, рассмотрению, обоснованию и утверждению плана исследования. Подпись главного исследователя означает, что он берет на себя полную ответственность за проведение исследования.

В Руководстве QPBR большое внимание уделено персоналу и профессиональной подготовке кадров. Все сотрудники, участвующие в исследовании, должны иметь письменные должностные инструкции и поддерживать свое резюме в актуальном состоянии.

Важной составляющей качественных исследований является наличие соответствующей материально-технической базы. В научно-исследовательском учреждении (лаборатории), работающем в соответствии с QPBR, важно предусмотреть мероприятия для предотвращения перекрестной контаминации оборудования, путаницы с образцами и т.п. Необходимо документальное подтверждение пригодности оборудования для проведения исследования, должна быть утвержденная программа его калибровки и технического обслуживания.

Огромное значение для обеспечения качества исследований имеет правильный алгоритм работы с документами по исследованию, начиная от надлежащей записи первичных данных и заканчивая составлением отчетов о полученных результатах. В Руководстве QPBR особо подчеркивается,

что без правильного оформления документации проведенное исследование теряет смысл.

В научно-исследовательском учреждении необходимо разработать Правила работы с первичными данными. Отчетность об исследовании должна включать достоверную и точную информацию, научное обсуждение результатов и заключение, сведения о любых отклонениях от плана (с объяснением причин). Ответственность за содержание отчета и научную интерпретацию полученных экспериментальных данных несет главный исследователь.

Ответственностью исследовательского учреждения, проводящего исследования в соответствии с QPBR, также является политика публикаций. Она включает установление авторства, экспертную (коллегиальную) оценку полученных результатов, вопросы патентования, гарантирует целостность данных (включая публикацию отрицательных результатов), целесообразность публикации одной или нескольких статей, определяет журналы для размещения публикаций.

Для гарантии качественного проведения исследования необходимо разработать стандартные операционные процедуры (СОП), которые описывают научную деятельность и регламентируют порядок выполнения исследований, а также обеспечивают своевременное обучение персонала. Формат СОП утверждается учреждением, проводящим исследование. Необходима система управления СОП: создание процедуры, ее утверждение, учет, внесение изменений, актуализация, архивирование и т.д.

Значимая роль в системе QPBR отводится этическим вопросам. Исследователь несет персональную ответственность за обеспечение гуманного обращения с экспериментальными животными, сохранение здоровья персонала, вовлеченного в экспериментальный процесс, экологическую безопасность.

Таким образом, система QPBR использует подходы к обеспечению качества фармакологических исследований, аналогичные требованиям НЛП к исследованиям безопасности, но допускает более гибкую их регламентацию.

Работа ВОЗ по созданию руководства и учебных пособий по QPBR была высоко оценена в мире. Так, в Великобритании считают, что усилия по подготовке кадров во всем мире, особенно в Азии, Латинской Америке и Африке, приведут к формированию общей культуры качественной практики научных исследований. Это, в свою очередь, должно помочь учреждениям в поисках партнерских отношений с государственным и частным сектором. В целом внедрение системы QPBR в практику будет содействовать экономически эффективным, ускоренным исследованиям с долгосрочным позитивным влиянием на разработку продуктов для улучшения здоровья человека²¹.

²¹ Quality Practices in Basic Biomedical Research (QPBR) training manual: Trainer. <https://www.gov.uk/dfid-research-outputs/quality-practices-in-basic-biomedical-research-qpbr-training-manual-trainer>

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение фармакологической безопасности является неотъемлемой частью доклинической оценки безопасности новых лекарственных препаратов, поэтому данный вид исследования должен соответствовать принципам НЛП. Изучение вторичной фармакодинамики рекомендуется проводить в соответствии с принципами НЛП, особенно в том случае, если данный вид исследований вносит важный вклад в оценку безопасности препарата. Изучение первичной фармакодинамики, таким образом, в настоящее время является нерегулируемым видом исследований.

Для качественного проведения нерегулируемых фармакологических исследований лекарственного препарата рассмотрена возможность использования стандартов ВОЗ по обеспечению качества базовых биомедицинских исследований.

Стандарты качества базовых фармакологических исследований (QPBR), в отличие от системы регламентации доклинических исследований безо-

пасности по НЛП, в настоящее время носят рекомендательный характер.

Вместе с тем внедрение стандартов QPBR позволит обеспечить надлежащую практику базовых фармакологических исследований, будет способствовать повышению достоверности, воспроизводимости и практической ценности полученных результатов при разработке лекарственных средств.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Вельц НЮ, Аляутдин РН, Казаков АС, Букатина ТМ, Дармостукова МА. Правила надлежащей лабораторной практики. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2016;(1):28–32. [Velts NYu, Alyautdin RN, Kazakov AS, Bukatina TM, Darmostukova MA. The rules of good laboratory practices. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii = Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2016;(1):28–32 (in Russ.)]
2. Вельц НЮ, Букатина ТМ, Пастернак ЕЮ, Николаева ТН, Романова СВ. Правила надлежащей лабораторной практики: анализ изменений законодательства. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2017;5(1):27–31. [Velts NYu, Bukatina TM, Pasternak EYu, Nikolaeva TN, Romanova SV. Rules of good laboratory practice: analysis of changes in the legislation. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii = Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2017;5(1):27–31 (in Russ.)]
3. Spindler P, Seiler JP. Quality management of pharmacology and safety pharmacology studies. *Fundam Clin Pharmacol*. 2002;16(2):83–90. PMID: 12031061
4. Davies R, London C, Lascelles B, Conzemius M. Quality assurance and best research practices for non-regulated veterinary clinical studies. *BMC Veterinary Research*. 2017;13(1):242. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1153-x>
5. Ioannidis JP, Greenland S, Hlatky MA, Khoury MJ, Macleod MR, Moher D, et al. Increasing value and reducing waste in research design, conduct, and analysis. *Lancet*. 2014;383(9912):166–75. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62227-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62227-8)
6. Алексеенко ИВ, Плешкан ВВ, Монастырская ГС, Кузьмич АИ, Снежков ЕВ, Дидыч ДА, Свердлов ЕД. Принципиально низкая воспроизводимость молекулярно-генетических исследований рака. *Генетика*. 2016;52(7):745–60. [Alekseenko IV, Pleshkan VV, Monastyrskaya GS, Kuzmich AI, Snezhkov EV, Didych DA, Sverdlov ED. Fundamentally low reproducibility in molecular genetic cancer research. *Genetika = Genetics*. 2016;52(7):745–60 (in Russ.)] <https://doi.org/10.7868/S0016675816070031>
7. Bustin SA. The reproducibility of biomedical research: Sleepers awake! *Biomol Detect Quantif*. 2014;(2):35–42. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.002>
8. Trotter AM. Best quality practices for biomedical R&D. Members from an ASQ working group provide analytical methods to enable PAT. *BioPharm International*. 2012;25(8). <https://www.biopharminternational.com/best-quality-practices-biomedical-rd>
9. Presot IM, Soares RPP, Madureira AP, Bicalho KA, Modena CM. Quality perception in research laboratories from Fiocruz after QMS implementation. *Rev Adm Pública*. 2014;48(1):237–52. <https://doi.org/10.1590/S0034-76122014000100010>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Энгальцева Галина Нинелевна, канд. биол. наук. *Galina N. Engalycheva*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5121-0858>
Сюбаев Рашид Даутович, д-р мед. наук. *Rashid D. Subaev*, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6729-2349>
Горячев Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук. *Dmitry V. Goryachev*, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8583-2372>

Статья поступила 06.12.2018
После доработки 20.08.2019
Принята к печати 19.11.2019

Article was received 6 December 2018
Revised 20 August 2019
Accepted for publication 19 November 2019

Механизм действия фоллистатин-подобного белка-1 (FSTL-1)

В. Г. Кукес^{1,*}, Ю. В. Олефир¹, Б. К. Романов¹, А. Б. Прокофьев¹, Е. В. Парфенова²,
М. А. Болдырева², О. А. Горошко¹, О. К. Парфенова³, А. А. Газданова³, Е. Ю. Демченкова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
3-я Черепковская ул., 15а, Москва, 121552, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

Резюме. Приведены современные данные о некоторых белках семейства TGF- β , потенциально способных оказывать протективное действие при патологиях сердца, легких, плаценты, половых желез и поджелудочной железы. Были изучены противовоспалительные свойства одного из представителей данного семейства белков — фоллистатин-подобного белка-1 (FSTL-1) на клеточном уровне. Установлено, что FSTL-1 отвечает за регенерацию сердечной мышцы у млекопитающих за счет активации ангиогенных факторов. Несмотря на ведущую роль данного белка в регенерации миокарда, его концентрация в эпикарде сразу после инфаркта уменьшается, что не позволяет сердцу эффективно самовосстанавливаться. Приведены данные исследований об эффективности внутривенного введения FSTL-1 у крыс с инфарктом миокарда. Однако поскольку введение чужеродного белка может вызывать аллергические реакции, более рациональным решением стал выбор лекарственного средства, индуцирующего секрецию FSTL-1. **Цель работы:** экспериментальное обоснование возможности применения экзогенной регуляции секреции фоллистатин-подобного белка-1. **Материалы и методы:** исследования концентрации FSTL-1 в плазме крыс проводили методом иммуноферментного анализа до и после курса применения антиоксидантного лекарственного средства этилметилгидроксипиридина малата. Антиоксидант вводили 15 здоровым самцам крыс линии Wistar подкожно 3 раза в сутки в дозе 6 мг/сут, курсом 14 суток. Кровь отбирали из вены натошак в первые сутки до введения препарата и на 15 сутки. **Результаты:** после курса введения этилметилгидроксипиридина малата концентрация FSTL-1 в плазме крови крыс достоверно ($p = 0,0011$) увеличивалась у экспериментальных животных и составила $0,92 \pm 0,11$ нг/мл относительно исходного значения $0,48 \pm 0,04$ нг/мл. **Заключение:** экспериментально подтверждены новые свойства этилметилгидроксипиридина малата — индукция фоллистатин-подобного белка-1 у здоровых крыс. Предлагается рассмотреть потенциальную возможность применения данного лекарственного средства как индуктора FSTL-1 при ишемии миокарда.

Ключевые слова: фоллистатин; фоллистатин-подобный белок-1; перекиси; ишемия миокарда; муковисцидоз; рак легкого

Для цитирования: Кукес ВГ, Олефир ЮВ, Романов БК, Прокофьев АБ, Парфенова ЕВ, Болдырева МА, Горошко ОА, Парфенова ОК, Газданова АА, Демченкова ЕЮ. Механизм действия фоллистатин-подобного белка-1 (FSTL-1). *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(4):256–260. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-256-260>

***Контактное лицо:** Кукес Владимир Григорьевич; elmed@yandex.ru

The Mechanism of Action of Follistatin-like Protein-1 (FSTL-1)

V. G. Kuker^{1,*}, Yu. V. Olefir¹, B. K. Romanov¹, A. B. Prokofiev¹, E. V. Parfenova²,
M. A. Boldyreva², O. A. Goroshko¹, O. K. Parfenova³, A. A. Gazdanova³, E. Yu. Demchenkova¹

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² National Medical Research Centre of Cardiology,
15A 3rd Cherepkovskaya St., Moscow 121552, Russian Federation

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University,
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

Abstract. The paper provides current data on some proteins of the TGF- β family which are potentially capable of exerting a protective effect in diseases of the heart, lungs, placenta, gonads, and pancreas. The study investigated the anti-inflammatory properties of follistatin-like protein-1 (FSTL-1), one of the proteins of this family, at the cellular level. It was demonstrated that FSTL-1 is responsible for heart muscle regeneration in mammals through activation of angiogenic factors. Despite the fact that this protein plays a key role in myocardial regeneration, its concentration in the epicardium decreases immediately after a heart attack, which

hampers effective self-repair of the heart. The paper summarises the results of studies of the efficacy of intravenous administration of FSTL-1 in rats with myocardial infarction. However, the administration of a foreign protein can cause allergic reactions, therefore a drug that induces FSTL-1 secretion was chosen instead. **The aim of the study** was to provide experimental substantiation of the possibility of exogenous regulation of FSTL-1 secretion. **Materials and methods:** FSTL-1 concentration in rat plasma was assessed by enzyme immunoassay before and after treatment with the antioxidant drug ethyl methyl hydroxypyridine malate. The antioxidant was administered to 15 healthy male Wistar rats subcutaneously 3 times a day at a dose of 6 mg/day for 14 days. A fasting blood sample was obtained on the first day before administration of the drug and on day 15. **Results:** after the period of treatment with ethyl methyl hydroxypyridine malate the concentration of FSTL-1 in the plasma of the laboratory rats increased significantly ($p = 0.0011$) to reach 0.92 ± 0.11 ng/mL as compared to the initial concentration of 0.48 ± 0.04 ng/mL. **Conclusion:** the study provided experimental evidence for new properties of ethyl methyl hydroxypyridine malate, i.e. induction of FSTL-1 in healthy rats. Further studies are encouraged to assess potential use of this drug as an inductor of FSTL-1 in myocardial ischemia. **Key words:** follistatin; follistatin-like protein-1; peroxides; myocardial ischemia; cystic fibrosis; lung cancer

For citation: Kukes VG, Olefir YuV, Romanov BK, Prokofiev AB, Parfenova EV, Boldyreva MA, Goroshko OA, Parfenova OK, Gazdanova AA, Demchenkova EYu. The mechanism of action of follistatin-like protein-1 (FSTL-1). *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(4):256–260. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-256-260>

*Corresponding author: Vladimir G. Kukes; elmed@yandex.ru

Фоллистатины относятся к семейству белков TGF- β . Функции доменов фоллистатина различны [1]. Их основное физиологическое действие — стимуляция роста специфических мышечных клеток сердца, подавление воспаления и фиброза легких. Фоллистатин ингибирует синтез белков и гормонов: активина (липидного регулятора) и фолликулостимулирующего гормона. Также фоллистатин играет важную роль в процессах стимуляции мышц и подавлении воспаления в легких. Фоллистатин синтезируется в разных органах и тканях: в мышцах, гипофизе, половой системе, сердце, фибробластах, дендритных и тучных клетках, макрофагах, эпителии дыхательных путей и Т-клетках, но основным источником циркулирующего фоллистатина является печень [1].

Семейство фоллистатиновых олигопептидов представлено несколькими формами. Первая форма состоит из 315 аминокислотных остатков, является короткоживущей (период полувыведения — около 1,5 ч), циркулирует в крови и там связывает миостатин. Вторая форма состоит из 288 аминокислотных остатков и связывается с межклеточным матриксом, где, вероятно, она связывает миостатин локально [2].

Синтезированный на рибосомах фоллистатин секретируется в эндоплазматическую сеть клетки, где от него отщепляется сигнальный пептид — активин-А, представитель семейства TGF- β , содержание которого увеличивается при муковисцидозе (МВ) [3]. Эффективность фоллистатина, который является естественным антагонистом активина-А, была продемонстрирована на трансгенной модели мыши с МВ, который проявляется в основном дыхательной недостаточностью (главная причина смерти при МВ) [3].

Фоллистатин обладает высоким аффинитетом к активину-А, он блокирует связывание рецептора активина-А и нейтрализует его действие.

Результаты клинических исследований на взрослых пациентах с муковисцидозом также продемонстрировали повышенный уровень активина-А в слюворотке с обратной корреляцией с функцией легких

и индексом массы тела в качестве индекса кахексии. Эти результаты указывают, что фоллистатин может быть перспективен при лечении заболеваний легких у пациентов с МВ [3].

Активин-А также регулирует рост и дифференцировку клеток, имеет иммунорегуляторные функции, играя важную роль в регуляции легочного воспаления и фиброза. Особое значение при воспалительных заболеваниях легких имеет индукция активин-А провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины IL-1 β , IL-6 и фактор некроза опухолей (TNF- α) [3].

Результаты исследований показывают, что фоллистатин, назначенный для профилактики сразу после постановки диагноза МВ, предотвращает развитие воспаления и гиперсекреции слизи, а также уменьшает тяжесть течения инфекций и ремоделирующего каскада воспалительных реакций, который в конечной форме приводит к усугублению болезни и смерти [3].

В настоящее время публикуется все больше результатов исследований фоллистатин-подобных белков, являющихся гликопротеидами, представителями семейства фоллистатина. Белки этого семейства имеют сходное строение с фоллистатином и могут использоваться в качестве маркеров воспаления. Особое внимание следует уделить фоллистатин-подобному белку-1, поскольку инфаркт миокарда является основной причиной смерти [4] в странах с развитой системой здравоохранения, включая Российскую Федерацию.

Фоллистатин-подобный белок-1 (FSTL-1) секретируется миоцитами. Его синтез активируется в ответ на ишемические повреждения. FSTL-1 не блокирует активин и миостатин, в отличие от фоллистатина. Были изучены противовоспалительные свойства FSTL-1 на клеточном уровне [4].

На основании анализа литературы нами установлено, что FSTL-1 отвечает за регенерацию сердечной мышцы у млекопитающих за счет активации ангиогенных факторов (рис. 1). Несмотря на ведущую роль данного белка в регенерации миокарда,

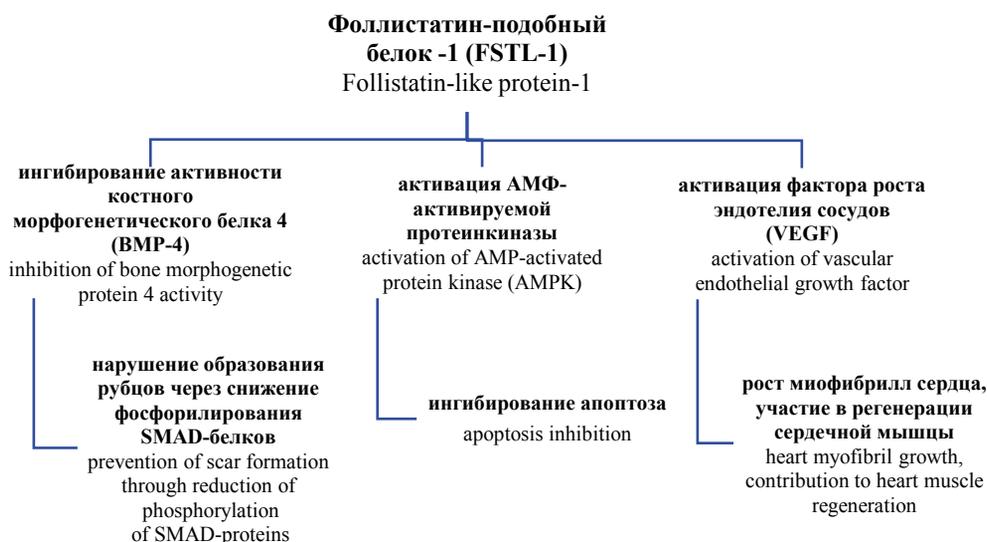


Рис. 1. Роль FSTL-1 при поражениях сердца

Fig. 1. FSTL-1 role in heart diseases

его концентрация в эпикарде сразу после инфаркта уменьшается, что не позволяет сердцу эффективно самовосстанавливаться. Увеличить концентрацию FSTL-1 в пораженном участке сердца можно применением «заплатки», насыщенной данным протеином. При наложении «заплатки» происходит постепенное высвобождение FSTL-1, и, достигая миокарда, этот белок запускает процесс регенерации. Это существенно улучшало функцию сердца животных и увеличивало выживаемость, даже если «заплатка» была наложена через неделю после перенесенного инфаркта [5]. Данный метод лечения был запатентован в 2018 году¹. Также было установлено, что инъекции FSTL-1 могут предотвращать повреждение миокарда, вызванное ишемией, путем ингибирования апоптоза и воспалительных реакций посредством активации АМФ-активируемой протеинкиназы и ингибированием BMP-4 [4].

Таким образом, можно выделить три основных действия FSTL-1 при поражениях сердца:

- 1) ингибирование активности костного морфогенетического белка 4, из-за чего нарушается образование рубцов через снижение фосфорилирования SMAD-белков [4];
- 2) активация АМФ-активируемой протеинкиназы (АМПК) с последующим ингибированием апоптоза [4];
- 3) активация фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и рост миофибрилл сердца, что содействует регенерации сердечной мышцы [5].

Кроме действия на мышцы сердца, FSTL-1 влияет на легочную ткань [9, 10]. Показано, что уменьшение содержания FSTL-1 у мышей приводит к постнатальной летальности в результате респираторной недостаточности. Также показано,

что FSTL-1 необходим для формирования хряща трахеи и альвеолярного созревания. Удаление гена FSTL-1 приводит к образованию поврежденных колец трахеи, проявляющихся в виде остановленных в развитии колец и уменьшенного количества сформированных колец [6].

J. Chiou и соавт. было установлено, что FSTL-1 играет важную роль в развитии рака легких. Результаты исследования показали, что низкая экспрессия FSTL-1 коррелировала с плохим прогнозом при раке легких, а пациенты с аденокарциномой легких и с низкой экспрессией BMP-4 или SMAD4 также показали тенденцию к неблагоприятному прогнозу. Низкая экспрессия FSTL-1, BMP-4 и SMAD4 чаще наблюдалась у курящих пациентов с аденокарциномой. Отмечено, что FSTL-1 ослабляет индуцированную никотином пролиферацию этих же клеток и может предотвратить пролиферацию клеток рака легкого, вызванную никотином [7]. В связи с тем что ишемия способна повреждать центры синтеза FSTL-1, в разных странах предпринимаются попытки его синтезировать, чтобы получить и применять экзогенный FSTL-1 у больных с хронической сердечной недостаточностью. При этом необходимо учитывать, что введение чужеродного белка может вызывать аллергические реакции. Нами предпринята попытка поиска лекарственного средства-активатора, которое может повысить уровень эндогенного FSTL-1.

Цель работы — экспериментальное обоснование возможности применения экзогенной регуляции секреции фоллистатин-подобного белка-1.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: проанализировать данные литературы по применению FSTL-1 в доклинических исследованиях у животных;

¹ Patent WO-2018052374-A1. Modulation of TJP1 expression to regulate regeneration of heart cells.

экспериментально оценить влияние вероятного экзогенного модулятора на динамику концентрации FSTL-1 в плазме крови животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Индукцию синтеза FSTL-1 изучали после применения лекарственного средства этилметилгидроксипиридина малата (ЭМГПМ). Исследования концентрации FSTL-1 в плазме крыс проводили до и после курса ЭМГПМ методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов производства «Cloud-Clone Corp.» (USA) для определения FSTL-1 у крыс.

Для экспериментальной проверки полученных результатов ЭМГПМ вводили 15 здоровым самцам крыс линии Wistar подкожно 3 раза в сутки в дозе 6 мг/сут курсом 14 суток (при массе животного 250 г суточная доза составляла 24 мг/кг). Для улучшения всасывания и повышения точности дозирования препарат разводили физиологическим раствором таким образом, чтобы разовый объем введения составлял 200 мкл. Кровь отбирали из вены натошак в первые сутки до введения препарата и на 15 сутки, центрифугировали 10 мин при 1500g, плазму переносили в пластиковые пробирки и хранили при -20°C .

Биологический материал предоставлен ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России

на безвозмездной основе. Исследование проводилось в соответствии с правилами основных документов, регламентирующих проведение экспериментов на лабораторных животных и условия их содержания: «Правила надлежащей лабораторной практики», утвержденные приказом Минздрава России № 199н от 1 апреля 2016 г., и Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Хирургические манипуляции и процедуры эвтаназии, разработанные в соответствии с национальными и европейскими директивами, были одобрены управлением по этике и уходу за животными (ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, разрешение № 385.06.2009).

Анализ результатов проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA. Достоверность различий оценивалась с помощью критерия Стьюдента и коэффициента корреляции Пирсона, статистически достоверными считали результаты с уровнем значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После курса введения ЭМГПМ концентрация FSTL-1 достоверно ($p = 0,0011$) увеличивалась у 13 из 15 животных. Исходная концентрация FSTL-1 в плазме крови крыс составила $0,48 \pm 0,04$ нг/мл,

Таблица 1. Концентрация фоллистатин-подобного белка-1 (FSTL-1) в плазме крови крыс до и после курсового введения этилметилгидроксипиридина малата (ЭМГПМ)

Table 1. Concentration of follistatin-like protein-1 (FSTL-1) in rat plasma before and after a course of treatment with ethyl methyl hydroxypyridine malate (EMHPM)

№ животного Animal No.	Концентрация FSTL-1 до введения ЭМГПМ, нг/мл FSTL-1 concentration before administration of EMHPM, ng/mL	Концентрация FSTL-1 после курса введения ЭМГПМ, нг/мл FSTL-1 concentration after the course of treatment with EMHPM, ng/mL
1	0,544	0,966
2	0,628	2,203
3	0,248	0,563
4	0,392	1,192
5	0,905	0,765
6	0,498	1,208
7	0,467	0,451
8	0,432	0,707
9	0,346	0,401
10	0,585	0,794
11	0,397	1,022
12	0,585	1,139
13	0,426	1,035
14	0,420	0,608
15	0,409	0,839
M_{cp}	0,48	0,92
SEM	0,04	0,11

Примечание. M_{cp} — среднее значение; SEM — стандартная ошибка среднего.

Note. M_{cp} — mean value; SEM — standard error of the mean.

а после курса введения ЭМГПМ — $0,92 \pm 0,11$ нг/мл (табл. 1).

Определен диапазон разброса концентраций FSTL-1: у интактных крыс он составил 0,25–0,58 нг/мл, у получавших ЭМГПМ — 0,45–2,20 нг/мл (рис. 2).

Полученные данные отчасти могут объясняться механизмом действия антиоксидантов, в т.ч. ЭМГПМ, приводящим к росту содержания АТФ, повышению сократительной способности скелетных мышц и кардиомиоцитов, что косвенно могло привести к повышению концентрации FSTL-1 [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экспериментально подтверждена возможность экзогенной индукции фоллистатин-подобного белка-1 у здоровых крыс после курсового применения лекарственного средства этилметилгидроксипиридина малата. Однако для подтверждения возможности данного эффекта препарата при ишемии необходимо проведение дальнейших исследований.

Благодарности. Работа проведена без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lee SJ, Lee YS, Zimmers TA, Soleimani A, Matzuk MM, Tsuchida K, Cohn RD, Barton ER. Regulation of muscle mass by follistatin and activins. *Mol Endocrinol.* 2008;24(10):1998–2008. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0127>
- Keutmann HT, Schneyer AL, Sidis Y. The role of follistatin domains in follistatin biological action. *Mol Endocrinol.* 2004;18(1):228–40. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0112>
- Hardy CL, King SJ, Mifsud NA, Hedger MP, Phillips DJ, Mackay F, et al. The activin A antagonist follistatin inhibits cystic fibrosis-like lung inflammation and pathology. *Immunol Cell Biol.* 2015;93(6):567–74. <https://doi.org/10.1038/icb.2015.7>
- Ogura Y, Ouchi N, Ohashi K, Shibata R, Kataoka Y, Kambara T, et al. Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical models. *Circulation.* 2012;126(14):1728–38. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.115089>
- Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, Diez-Cunado M, Zhao M, Maruyama S, et al. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature.* 2015;525(7570):479–85. <https://doi.org/10.1038/nature15372>
- Geng Y, Dong Y, Yu M, Zhang L, Yan X, Sun J, et al. Follistatin-like 1 (Fstl1) is a bone morphogenetic protein (BMP) 4 signaling antagonist in controlling mouse lung development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(17):7058–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007293108>
- Chiou J, Su CY, Jan YH, Yang CJ, Huang MS, Yu YL, Hsiao M. Decrease of FSTL1-BMP4-Smad signaling predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma but not in squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* 2017;(7):9830. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10366-2>
- Zhu Z, Sierra A, Burnett CM, Chen B, Subbotina E, Koganti SR, et al. Sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels modulate skeletal muscle function under low-intensity workloads. *J Gen Physiol.* 2014;143(1):119–34. <https://doi.org/10.1085/jgp.201311063>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Кукес Владимир Григорьевич, академик РАН, д-р мед. наук, проф. *Vladimir G. Kukes*, Academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5112-6928>

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, ст. науч. сотр. *Yuri V. Olefir*, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7652-4642>

Романов Борис Константинович, д-р мед. наук, доцент. *Boris K. Romanov*, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5429-9528>

Прокофьев Алексей Борисович, д-р мед. наук, проф. *Alexey B. Prokofiev*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7024-5546>

Парфенова Елена Викторовна, д-р мед. наук, проф. *Elena V. Parfenova*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3947-572X>

Болдырева Мария Александровна, канд. биол. наук. *Maria A. Boldyreva*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8309-0018>

Горошко Ольга Александровна, канд. фарм. наук. *Olga A. Goroshko*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0448-3612>

Парфенова Ольга Константиновна. *Olga K. Parfenova*.

Газданова Альбина Амырхановна, канд. биол. наук, доцент. *Albina A. Gazdanova*, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7099-4547>

Демченкова Елена Юрьевна, канд. фарм. наук. *Elena Yu. Demchenkova*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1972-4386>

Статья поступила 03.06.2019

После доработки 09.09.2019

Принята к печати 19.11.2019

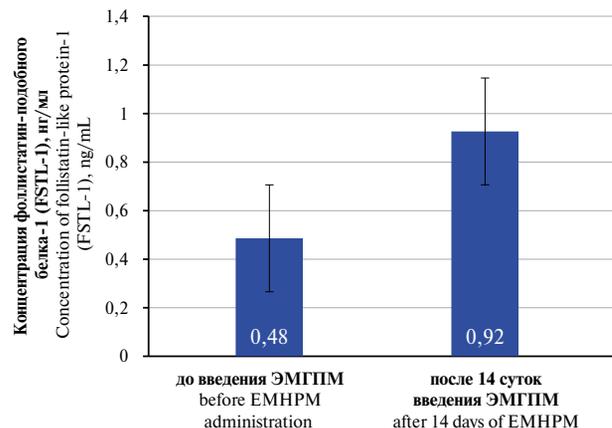


Рис. 2. Концентрация FSTL-1 в плазме до и после курса введения этилметилгидроксипиридина малата (ЭМГПМ). Вертикальными отрезками обозначен диапазон разброса концентраций

Fig. 2. FSTL-1 concentration in plasma after a course of treatment with ethyl methyl hydroxypyridine malate (EMHPM). The vertical bars show the concentration range

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Рентгенофазовый анализ кристаллических форм линезолида при контроле качества фармацевтической субстанции

В. С. Кузьмин^{1,*}, В. В. Чернышев², А. И. Лутцева¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация
² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Ленинские Горы, д. 1, стр. 3, Москва, 119991, Российская Федерация

Резюме. Работа является продолжением исследований по применению метода рентгенофазового анализа (РФА) для подтверждения подлинности лекарственных средств, обладающих полиморфизмом. **Цель работы:** сравнительный анализ образцов субстанции линезолида разных производителей методом РФА. **Материалы и методы:** измерения проводили на порошковом дифрактометре Empyrean (PANalytical, Нидерланды) с линейным твердофазным детектором X'Celerator с использованием CuK_α-излучения и никелевого фильтра. Результаты регистрировали при длинах волн излучения 1,5406 и 1,5444 Å с соотношением интенсивностей в дублете 2:1. Для количественной оценки использовали двухфазное уточнение полученных дифрактограмм методом Ритвельда. **Результаты:** проведено сравнение дифрактограмм трех промышленных образцов линезолида. Выявленные различия проанализированы на основании имеющихся в литературе данных о полиморфных модификациях линезолида. Установлено, что только формы II и IV следует считать различными полиморфными модификациями линезолида. **Выводы:** установлено, что образцы субстанции линезолида разных производителей могут представлять собой различные полиморфные модификации или их смеси. Для оценки качества фармацевтической субстанции линезолида методом рентгенофазового анализа необходимо сравнение полученных результатов с дифрактограммой стандартного образца формы IV и включение данного требования в нормативную документацию на лекарственное средство.

Ключевые слова: экспертиза качества; полиморфизм; линезолид; рентгенофазовый анализ; конформеры

Для цитирования: Кузьмин ВС, Чернышев ВВ, Лутцева АИ. Рентгенофазовый анализ кристаллических форм линезолида при контроле качества фармацевтической субстанции. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(4):261–264. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-261-264>

***Контактное лицо:** Кузьмин Владимир Семенович; KuzminVS@xpmmed.ru

X-ray Diffraction Analysis of Linezolid Crystalline Forms as Part of Quality Control of the Active Ingredient

V. S. Kuzmin^{1,*}, V. V. Chernyshev², A. I. Luttseva¹

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation
² M. V. Lomonosov Moscow State University,
1/3 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation

Abstract. This work is a continuation of research on the use of X-ray diffraction analysis (XRD) for identification of medicines that exhibit polymorphism. **The aim** of the paper was to perform comparative XRD analysis of linezolid samples produced by different manufacturers. **Materials and methods:** the measurements were performed using an Empyrean X-ray powder diffraction system (PANalytical, Netherlands) with an X'Celerator linear solid-state detector using Ni-filtered CuK_α radiation. The results were recorded at 1.5406 and 1.5444 Å with the intensity ratio in the doublet of 2:1. The two-phase Rietveld refinement of the obtained diffractograms was used for the quantitative analysis. **Results:** the authors compared diffractograms of three commercial samples of linezolid. The revealed differences were analysed taking into consideration available literature on the polymorphic forms of linezolid. It was demonstrated that only forms II and IV should be considered as different polymorphs of linezolid. **Conclusions:** the study demonstrated that linezolid samples produced by different manufacturers could represent different polymorphs or mixtures thereof. The evaluation of linezolid quality by X-ray diffraction analysis requires the comparison of the obtained results with the diffractogram of the form IV reference standard. Relevant information should be provided by manufacturers in the product specification file.

Key words: quality control; polymorphism; linezolid; X-ray diffraction analysis; conformers

For citation: Kuzmin VS, Chernyshev VV, Luttseva AI. X-ray diffraction analysis of linezolid crystalline forms as part of quality control of the active ingredient. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(4):261–264. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-261-264>

***Corresponding author:** Vladimir S. Kuzmin; KuzminVS@xpmmed.ru

Значимость и необходимость использования метода рентгеновской порошковой дифрактометрии (метода рентгенофазового анализа, РФА) при проведении оценки качества лекарственных средств по показателю «Подлинность» описана авторами в работе «Рентгеновская порошковая дифрактометрия: контроль качества лекарственных средств» [1]. Применение метода РФА особенно актуально для лекарственных средств, существующих в различных полиморфных модификациях. При подтверждении подлинности фармацевтических субстанций, обладающих полиморфизмом, данный метод имеет преимущество перед другими инструментальными методами идентификации органических соединений (ЯМР-, ИК-, УФ-спектроскопии и хроматомасс-спектрометрии).

Линезолид, который может существовать в различных полиморфных формах, является одним из основных представителей класса оксазолидинонов, проявляющих активность против грамположительных микроорганизмов [2].

Цель работы — сравнительный анализ образцов субстанции линезолида разных производителей методом РФА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы субстанции линезолида были получены от трех производителей: Glenmark Life Sciences Ltd, India (образец 1); ООО «БратскХимСинтез», Россия (образец 2) и Pfizer Asia Pacific Pte Ltd, Singapore (образец 3).

Рентгеновские дифракционные измерения порошковых образцов проводили на дифрактометре Empyrean (PANalytical, Netherlands) с линейным твердофазным детектором X'Celerator с использованием CuK_α -излучения и никелевого фильтра. Результаты регистрировали, учитывая длины волн — 1,5406 и 1,5444 Å с соотношением интенсивностей в дублете 2:1. Напряжение и ток на рентгеновской трубке составляли 45 кВ и 35 мА соответственно. Образцы осторожно растирали в агатовой ступке и помещали в кремниевую кювету, обеспечивающую минимальный фон. Измерения проводили в геометрии Брэгга—Брентано (на отражение) в области углов 5° – 50° 2θ , тип сканирования — непрерывный, скорость сканирования 0,3 град./мин с шагом $0,017^\circ$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для субстанции линезолида описаны и задокументированы следующие полиморфные формы — I [3], II [4], III [5] и IV [6]. Кроме того, D. Joshipura и A. Kulshrestha утверждают, что перекристаллизацией субстанции линезолида при комнатной температуре из метанола, пропанола и этанола им удалось получить три новые полиморфные формы, которые они обозначили A1, B1 и C1 соответственно и которые отличаются от четырех предыдущих [7]. Однако

эти результаты пока не получили независимого подтверждения, и в дальнейшем мы будем рассматривать только формы I–IV.

На рисунке 1 показаны рентгеновские дифрактограммы трех исследованных образцов субстанции линезолида. Заметны различия в дифрактограммах как по положениям пиков, так и по соотношениям их высот. В рентгенофазовом анализе для идентификации конкретной кристаллической фазы принципиальным является набор положений пиков, так как при совпадении положений пиков различие в соотношении их высот может быть обусловлено наличием текстуры в образце. Перед тем как приступить к РФА исследованных образцов, мы подвергнем тщательному анализу литературные данные о формах I–IV линезолида.

Детальное и полное изучение кристаллических модификаций линезолида методами рентгеноструктурного анализа, РФА, дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК), а также ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР проведено в работе [8]. Авторы установили кристаллические структуры полиморфных форм II и IV и, основываясь на результатах комплексного исследования форм II и IV, убедительно доказали, что энергетический барьер перехода формы II в IV невысок и происходит при нагревании до 120°C . Обратный переход из формы IV в II легко происходит при повышенной влажности, суспендировании или измельчении. Выявлены различия в конформациях независимых молекул в кристаллических фазах II и IV, что согласуется с невысоким значением энергетического барьера фазового перехода. Также авторы отметили, что форма III не является новой полиморфной модификацией, а представляет собой смесь форм II и IV [8]. Форма I линезолида не была

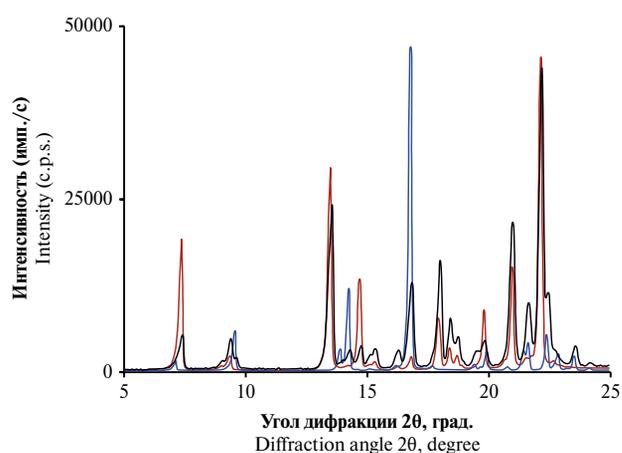


Рис. 1. Сравнение дифрактограмм образцов линезолида в области углов 5° – 25° 2θ (кривая красного цвета — образец 1, кривая синего цвета — образец 2, кривая черного цвета — образец 3)

Fig. 1. The comparison of linezolid diffractograms in the angular range of 5° – 25° 2θ (red curve — sample 1, blue curve — sample 2, black curve — sample 3)

Таблица 1. Положения (2θ) и относительные интенсивности основных дифракционных пиков форм II и IV линезолида
Table 1. The positions (2θ) and relative intensities of the main diffraction peaks of linezolid forms II and IV

Форма II Form II		Форма IV Form IV	
2θ , град. 2θ , degree	Относительная интенсивность, % Relative intensity, %	2θ , град. 2θ , degree	Относительная интенсивность, % Relative intensity, %
7,12	3	7,35	42
9,57	12	8,98	1
13,91	5	9,35	5
14,27	23	13,51	70
16,83	100	14,74	33
19,46	2	15,36	3
19,98	6	16,82	3
21,47	5	17,99	18
21,66	8	18,44	6
22,44	12	19,86	15
22,89	5	21,03	35
23,57	4	22,18	100

подробно изучена в работе [8], однако сравнение дифрактограммы формы I, впервые полученной в [3], а также дифрактограммы формы I, приведенной в [9], с дифрактограммой формы IV [8] показывает их полное соответствие, т.е. формы I и IV представляют собой одну и ту же полиморфную модификацию. Далее мы будем использовать нумерацию форм, которую использовали авторы в работе [8].

Мы делаем заключение, что только формы II и IV являются различными полиморфными модификациями линезолида. Термостабильной является форма IV, поэтому Управление по контролю за каче-

ством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) с 2000 г. рекомендует использовать именно эту форму при производстве различных лекарственных средств, содержащих линезолид [10].

Наборы полученных в нашей работе основных характерных дифракционных пиков, с помощью которых можно различить формы II и IV линезолида, приведены в таблице 1.

При сравнении положений основных пиков на дифрактограммах образцов 1 и 2 с положениями пиков, указанных в таблице, установлено, что образец 1 соответствует форме IV, а образец 2 — форме II. Более того, имеющиеся сведения о кристаллических структурах форм II (ромбическая сингония) и IV (триклинная сингония) позволили провести уточнение методом Ритвельда по всей дифрактограмме с помощью программы MRIA [11]. Проведенное уточнение показало, что каждая из дифрактограмм полностью соответствует только одной кристаллической фазе, т.е. образцы 1 и 2 являются однофазными, хотя и содержат разные полиморфные модификации.

На дифрактограмме образца 3 присутствуют в основном пики, характерные для формы IV линезолида, и вместе с тем некоторые пики, соответствующие форме II. Двухфазное уточнение методом Ритвельда дифрактограммы образца 3 (рис. 2) позволило провести количественную оценку соотношения форм IV и II в образце 3, которое составило 9:1.

Следует отметить, что наличие в коммерческом образце субстанции линезолида (форма IV) примеси формы II описано авторами работы [10]. Исследуя методом РФА полиморфные модификации II и IV линезолида, М. Sun с соавт. установили, что в субстанции формы IV, которая используется

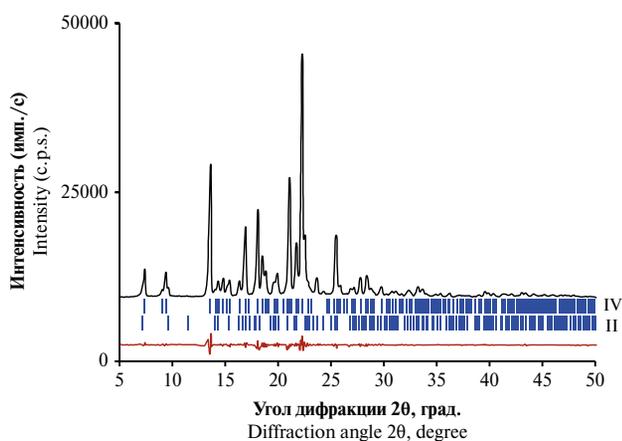


Рис. 2. Результат двухфазного уточнения дифрактограммы образца 3 методом Ритвельда по программе MRIA (черным цветом — экспериментальная кривая, красным цветом — разностная кривая, вертикальные отрезки синего цвета — рассчитанные положения пиков линезолида, верхний ряд — форма IV, нижний ряд — форма II)

Fig. 2. The results of two-phase Rietveld refinement of the sample 3 diffractogram using the MRIA programme (black line — fitted curve, red line — difference curve, vertical blue lines — calculated positions of linezolid peaks, upper row — form IV, lower row — form II)

для производства таблеток линезолида, присутствует около 1 % (по массе) формы II. Авторы также утверждают, что присутствие в фармакопейной субстанции линезолида примеси формы II даже в небольшом количестве способствует конформационной конверсии субстанции из формы IV в форму II [10].

В литературе не найдены данные о различиях в биодоступности полиморфных модификаций линезолида. Более того, нет однозначной информации о биодоступности линезолида безотносительно к полиморфным модификациям. Например, по данным опубликованных отчетов Всемирной организации здравоохранения¹ линезолид отнесен к классу I по биофармацевтической классификационной системе (БКС). Соединения этого класса характеризуются хорошей растворимостью в биологических жидкостях и хорошей проницаемостью через биомембраны. В то же время А.М. Kadam и S.S. Patil относят линезолид к классу IV системы БКС (низкая растворимость, низкая проницаемость) [12]. Можно предположить, что отнесение линезолида к различным классам БКС связано с тем, что в исследованиях по растворимости и биопроницаемости использовали субстанции разных полиморфных модификаций.

Производители линезолида используют метод РФА при определении подлинности субстанции для подтверждения, что в образце присутствует только одна полиморфная модификация, однако в нормативной документации отсутствует четкое

указание на необходимость использования стандартного образца формы IV линезолида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты собственных исследований фармацевтической субстанции линезолида показали, что образцы субстанции разных производителей могут представлять собой различные полиморфные модификации линезолида или их смеси.

Следовательно, при использовании метода рентгеновской порошковой дифрактометрии для оценки качества фармацевтической субстанции линезолида необходимо ввести дополнительное требование — сравнивать результаты анализа с дифрактограммой стандартного образца формы IV и представлять соответствующую информацию в нормативной документации на лекарственное средство.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Кузьмин ВС, Чернышев ВВ, Лутцева АИ. Рентгеновская порошковая дифрактометрия: контроль качества лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;(3):158–61. [Kuzmin VS, Chernyshev VV, Lutseva AI. X-ray powder diffraction in quality control of medicines. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;(3):158–61 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-158-161>
- Ефременкова ОВ, Белоусов ЮБ. Линезолид — первый препарат нового класса антибактериальных средств оксазолидинонов. *Качественная клиническая практика*. 2002;(2):2–11. [Efremenkova OV, Belousov YuB. Linezolid — the first drug of a new class of antibacterial agents oxazolidinones. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika = Good Clinical Practice*. 2002;(2):2–11 (In Russ.)]
- Brickner SJ, Hutchinson DK, Barbachyn MR, Manninen PR, Ulanowicz DA, Garmon SA, et al. Synthesis and antibacterial activity of U-100592 and U-100766, two oxazolidinone antibacterial agents for the potential treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. *J Med Chem*. 1996;39(3):673–9. <https://doi.org/10.1021/jm9509556>
- Bergren MS. Linezolid — crystal form II. Patent No. US6559305B1; 2003.
- Mohan Rao D, Krishna Reddy P. A novel crystalline form of linezolid. Patent No. WO/2005/035530; 2005.
- Aronhime J, Koltai T, Braude V, Fine S, Niddam T. Crystalline form IV of linezolid. Patent No. WO/2006/004922; 2006.
- Joshipura D, Kulshrestha A. Crystal forms of linezolid. *Der Pharmacia Lettre*. 2013;5(1):279–84.
- Maccaroni E, Alberti E, Malpezzi L, Masciocchi N, Vladiskovic C. Polymorphism of linezolid: a combined single-crystal, powder diffraction and NMR study. *Int J Pharm*. 2008;351(1–2):144–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.09.028>
- Karagiannidou EG. Solid state characterization of linezolid crystal forms. *International Journal of Analytical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2013;2(2). https://www.researchgate.net/publication/256684948_Solid_State_Characterization_of_Linezolid_Crystal_forms
- Sun M, Hu X, Zhou X, Gu J. Determination of minor quantities of linezolid polymorphs in a drug substance and tablet formulation by powder X-ray diffraction technique. *Powder Diffraction*. 2017;32(2):78–85. <https://doi.org/10.1017/S0885715617000069>
- Zlokazov VB, Chernyshev VV. MRSA — a program for a full profile analysis of powder multiphase neutron-diffraction time-of-flight (direct and Fourier) spectra. *J Appl Cryst*. 1992;25:447–51.
- Kadam AM, Patil SS. Improvement of micromeritic, compressibility and solubility characteristics of linezolid by crystallo-co-agglomeration technique. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2017;9(4):47–53. <https://doi.org/10.22159/ijap.2017v9i4.18915>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Кузьмин Владимир Семенович, д-р хим. наук. *Vladimir S. Kuzmin*, Dr. Sci. (Chem.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2533-8142>
Чернышев Владимир Васильевич, д-р физ.-мат. наук. *Vladimir V. Chernyshev*, Dr. Sci. (Phys.-Math.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8514-7471>
Лутцева Анна Ивановна, канд. фарм. наук. *Anna I. Lutseva*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8752-5245>

Статья поступила 19.06.2019

После доработки 06.09.2019

Принята к печати 19.11.2019

Article was received 19 June 2019

Revised 6 September 2019

Accepted for publication 19 November 2019

¹ <https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/TB299part6v1.pdf>

Современные подходы к стандартизации настойки валерианы по показателю «Количественное определение»

Н. П. Антонова, Е. П. Шефер*, А. М. Калинин, Н. Е. Семенова, С. С. Прохвятилова,
И. М. Моргунов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Резюме. Оценка качества лекарственного растительного сырья «Валерианы лекарственной корневища с корнями», согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания, проводится с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для количественного анализа действующих веществ в настойке валерианы используется неспецифическая и неселективная методика спектрофотометрического определения. Поэтому внедрение в отечественную практику более современной методики количественного определения действующих веществ в настойке валерианы является актуальным. **Цель работы:** разработка селективной и чувствительной методики количественного определения суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту методом ВЭЖХ для стандартизации настойки валерианы. **Материалы и методы:** объектами исследования являлись образцы настойки валерианы семи отечественных производителей, в качестве стандартного образца использовалась валереновая кислота. Количественное определение действующих веществ проводилось двумя методами: спектрофотометрическим при длине волны 512 нм после реакции этилового эфира валереновой кислоты с гидроксиламином и железа(III) хлоридом, а также методом ВЭЖХ на колонке Nucleosil C18 размером 125×4,6 мм с размером частиц 5 мкм в условиях градиентного элюирования с детектированием при 220 нм. **Результаты:** показано, что спектрофотометрическая методика анализа недостаточно специфична. Проведена валидация хроматографической методики, выбраны критерии пригодности системы и выполнено сравнение результатов анализа, полученных двумя методами. Установлено предварительное значение нормы содержания суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту, определяемого методом ВЭЖХ. **Выводы:** разработанная методика определения действующих веществ в настойке валерианы методом ВЭЖХ более специфична по сравнению со спектрофотометрической методикой, так как для расчетов предусматриваются учет суммы пиков валереновой и ацетокси валереновой кислот и использование стандартного образца валереновой кислоты. Методика соответствует принципу сквозной стандартизации и может быть рекомендована для включения в проект фармакопейной статьи на препарат «Валерианы настойка».

Ключевые слова: настойка; валериана лекарственная; ВЭЖХ; валереновая кислота; ацетокси валереновая кислота; фармакопейные методы анализа; *Tinctura Valerianae*

Для цитирования: Антонова НП, Шефер ЕП, Калинин АМ, Семенова НЕ, Прохвятилова СС, Моргунов ИМ. Современные подходы к стандартизации настойки валерианы по показателю «Количественное определение». *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(4):265–271. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-265-271>

***Контактное лицо:** Шефер Елена Павловна; shefer@expmed.ru

Current Approaches to Valerian Tincture Standardisation in Terms of Assay

N. P. Antonova, E. P. Shefer*, A. M. Kalinin, N. E. Semenova, S. S. Prokhvatilova,
I. M. Morgunov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract. The quality control of the «Valerian rhizome and roots» herbal substance is carried out using high performance liquid chromatography (HPLC) according to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition. The quantitative analysis of the active ingredients in valerian tincture is performed using a non-specific and non-selective spectrophotometric method. Therefore, it is important to introduce in Russia a more modern test procedure for quantitative determination of active ingredients in valerian tincture. **The aim of the study** was to develop a selective and sensitive HPLC procedure for quantitative determination of the total content of sesquiterpene acids, expressed as valerenic acid, for the purpose of valerian tincture standardisation. **Materials and methods:** valerian tincture samples produced by seven Russian manufacturers were used as test samples, and valerenic acid was used as the reference standard. The quantitative analysis of the active ingredients was performed by two methods: spectrophotometry at 512 nm following the reaction of valerenic acid ethylester with hydroxyalaminine and ferric chloride, and by HPLC using a Nucleosil C18 column, 125×4.6 mm, 5 µm particle size, in gradient elution mode, with detection at 220 nm. **Results:** the spectrophotometric technique was shown to be insufficiently specific. The authors of the study validated the chromatographic test procedure, established system suitability criteria, and compared the results obtained by the two test procedures. They also determined a tentative standard of the total content of sesquiterpene acids, expressed as valerenic acid, obtained by HPLC. **Conclusions:** the HPLC assay developed for quantitative determination of active ingredients in valerian tincture is more specific as compared to the spectrophotometric technique, as the sum of the peaks of valerenic and acetoxylvalerenic acids and the results

for the reference standard are taken into account during calculations. The new test procedure is in line with the crosscutting standardisation principle and can be recommended for inclusion into the draft monograph «Valerian tincture».

Key words: tincture; valerian; HPLC; valerianic acid; acetoxyvalerianic acid; pharmacopoeial methods; *Tinctura Valerianae*

For citation: Antonova NP, Shefer EP, Kalinin AM, Semenova NE, Prokhvatilova SS, Morgunov IM. Current approaches to valerian tincture standardisation in terms of assay. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(4):265–271. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-265-271>

*Corresponding author: Elena P. Shefer; shefer@expmed.ru

Валериана лекарственная (*Valeriana officinalis* L., сем. Валериановые — *Valerianaceae*) является одним из самых популярных средств растительного происхождения, обладающих седативным, анксиолитическим и стресспротекторным действием [1]. Препараты валерианы лекарственной широко используются во всем мире благодаря богатому составу биологически активных веществ. Валерианы лекарственной корневища с корнями (*Valeriana officinalis rhizomata cum radicibus*) содержат большое количество эфирного масла, основную часть которого составляют сесквитерпены, монотерпены, борнилвалерианат, γ -аминомасляная кислота, изовалериановая кислота, тритерпеновые гликозиды, дубильные вещества [2–4]. Препараты валерианы лекарственной выпускаются в различных лекарственных формах, в том числе и в виде настоек. Использование одинаковых методов и одних и тех же биологически активных соединений для количественного определения в лекарственном растительном сырье и в препаратах на их основе лежит в основе принципа сквозной стандартизации.

По ФС.2.5.0009.15 «Валерианы лекарственной корневища с корнями» предусмотрены две методики количественного определения: экстрактивных веществ, извлекаемых 70 % спиртом этиловым, и суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Согласно ФС 42-3865-99 «Настойка валерианы», проводится спектрофотометрическое определение суммы сложных эфиров карбоновых кислот в пересчете на этиловый эфир валереновой кислоты. Недостатками данной методики являются низкие селективность и специфичность. Отсутствие четкого максимума поглощения на спектре испытуемого раствора при длине волны 512 нм и оценка по удельному показателю поглощения без использования стандартного образца определяют недостаточную селективность методики [5, 6]. О низкой специфичности этой основанной на гидроксамовой пробе методики свидетельствует то, что она была включена в нормативные документы для количественной оценки суммы иридоидов в пересчете на гарпагидацетат в настойке пустырника и содержания иридоидов в пересчете на пионифлорин в настойке пиона уклоняющегося.

В монографии «Валерианы настойка», согласно Европейской фармакопее и Фармакопее США,

нормируется содержание сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту (не менее 0,015 %). Определение проводят методом ВЭЖХ.

Учитывая вышесказанное, представляет интерес внедрение в отечественную практику более современной методики количественного анализа действующих веществ настойки валерианы с использованием метода ВЭЖХ, имеющего высокие чувствительность, точность и селективность, а также пригодность для анализа сложных смесей без предварительного разделения.

Цель работы — разработать методику количественного определения суммы сесквитерпеновых кислот методом ВЭЖХ в лекарственном препарате «Валерианы настойка» на основании методики, используемой для оценки качества лекарственного растительного сырья «Валерианы лекарственной корневища с корнями».

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- выбрать методику приготовления испытуемого и стандартного растворов, провести исследования полученных растворов в хроматографических условиях по методике, используемой для стандартизации лекарственного растительного сырья валерианы лекарственной;
- провести проверку пригодности хроматографической системы, определить основные критерии теста в условиях разработанной методики;
- оценить возможность замены спектрофотометрической методики на методику ВЭЖХ;
- установить нормы содержания суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту при анализе по разработанной методике ВЭЖХ с использованием образцов препарата различных производителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использованы образцы валерианы настойки семи отечественных производителей (№ 1–7).

В ходе первой части исследования проведено определение суммы сложных эфиров в каждом образце в пересчете на этиловый эфир валереновой кислоты методом спектрофотометрии по ФС 42-3865-99. Экстракцию 1,5 мл настойки проводили смесью хлороформа и спирта 96 %. После проведения реакции с гидроксиламином, железа(III)

хлоридом и хлористоводородной кислотой проводили измерение оптической плотности раствора при длине волны 512 нм. Регистрацию спектров поглощения проводили на спектрофотометре Agilent 8453.

Во второй части работы определение действующих веществ в тех же образцах проводили методом ВЭЖХ. Нами были использованы хроматографические условия в соответствии с методикой определения суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту по ФС.2.5.0009.15 «Валерианы лекарственной корневища с корнями». Для приготовления испытуемого раствора исходную настойку фильтровали через мембранный нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм (CHROMAFIL® Xtra PA 45/25).

Каждый испытуемый образец анализировали в виде трех параллельных проб, по результатам измерений рассчитывали относительное стандартное отклонение (*RSD*).

Для приготовления раствора стандартного образца использовали стандартный образец валереновой кислоты производства HWI group (кат. № 0201-05-95), содержание основного вещества в котором составляло 96,84 %. В качестве раствора стандартного образца использовали 0,01 % раствор валереновой кислоты в спирте 96 % для проведения испытания в соответствии с методикой и 0,5 % раствор валереновой кислоты в спирте 96 % для приготовления модельных смесей. Было приготовлено параллельно два стандартных раствора валереновой кислоты (СО1 и СО2). СО1 хроматографировали шесть раз и определяли относительное стандартное отклонение (*RSD*) для контроля воспроизводимости методики. Раствор СО2 использовали для контроля точности приготовления стандартных образцов, открываемость которых должна составлять от 98 до 102 %.

Использованное оборудование: жидкостный хроматограф Agilent 1260 Infinity II; электронные весы Mettler Toledo XPE205DR; система очистки воды Milli-Q Integral 5.

Испытание проводили на колонке размером 125×4,6 мм, заполненной сорбентом октадецилсилсилакагель (Nucleosil C18) с размером частиц 5 мкм в условиях градиентного элюирования (табл. 1). Детектирование осуществляли при длине волны 220 нм. Скорость потока составляла 1,0 мл/мин, температура колонки 25 °С, объем пробы — 10 мкл. Подвижная фаза А — ацетонитрил, подвижная фаза В — раствор фосфорной кислоты концентрированной 5,0 г/л в воде.

Время удерживания пика валереновой кислоты в описанных условиях составляло около 13 мин. Относительное время удерживания ацетокси валереновой кислоты (по валереновой кислоте) — 0,5.

Для расчета содержания суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту использовали суммарную площадь пиков валереновой и ацетокси валереновой кислот.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектрофотометрическое определение действующих веществ в препарате проводится по удельному показателю поглощения продукта реакции этилового эфира кислоты валереновой с гидроксиламином и железа(III) хлоридом, который определен при длине волны 512 нм. На рисунке 1 представлен спектр поглощения испытуемого раствора валерианы настойки в области от 400 до 650 нм и показано, что длина волны 512 нм не соответствует максимуму поглощения раствора.

В соответствии с нормативной документацией содержание суммы сложных эфиров в пересчете на этиловый эфир валереновой кислоты должно быть не менее 0,3 %. Результаты анализа испытуемых образцов № 1–7, полученные спектрофотометрическим методом, находились в диапазоне от 0,35 до 0,45 % (табл. 2).

При анализе методом ВЭЖХ по разработанной методике предусмотрено использование стандартного образца валереновой кислоты. На рисунке 2 представлена хроматограмма раствора

Таблица 1. Программа градиентного элюирования для определения суммы сесквитерпеновых кислот

Table 1. Gradient elution programme used to determine the total content of sesquiterpenic acids

Время, мин Time, min	Подвижная фаза А, об. % Mobile phase A, percent V/V	Подвижная фаза В, об. % Mobile phase B, percent V/V
0–5	47	53
5–7	47→50	53→50
7–9	50	50
9–16	50→60	50→40
16–20	60	40
20–25	60→100	40→0
25–30	100→47	0→53
30–45	47	53

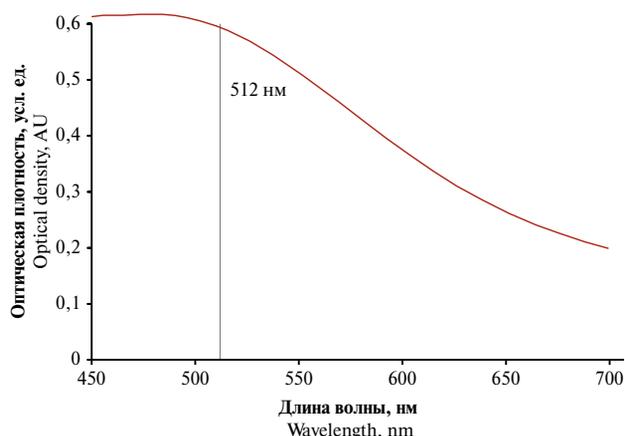


Рис. 1. Спектр поглощения испытуемого раствора валерианы настойки

Fig. 1. The absorption spectrum of the valerian tincture test solution

стандартного образца валереновой кислоты и испытуемого раствора образцов валерианы настойки, полученные в описанных выше условиях. Время удерживания пика валереновой кислоты на хроматограмме раствора испытуемого образца соответствовало времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца — 12,98 мин.

Время удерживания ацетоксивалереновой кислоты в описанных условиях составило около 6 мин (рис. 2), при этом ее относительное время удерживания по валереновой кислоте соответствовало указанному в ФС.2.5.0009.15 и составило 0,5.

Была проведена оценка пригодности хроматографической системы по следующим параметрам:

- значение асимметрии пиков валереновой кислоты на хроматограммах испытуемых растворов и раствора стандартного образца находилось на уровне 0,8;

- эффективность колонки по пику валереновой кислоты на хроматограммах испытуемого раствора и раствора стандартного образца составило 11 200 теоретических тарелок;

- относительное стандартное отклонение площади пика валереновой кислоты на хроматограммах раствора стандартного образца для 6 определений составило 0,06 %.

С учетом фактически полученных результатов для оценки пригодности хроматографической системы были установлены следующие требования:

- значение асимметрии пиков валереновой кислоты на хроматограммах раствора стандартного образца должно быть не более 2,0;

- эффективность колонки по пику валереновой кислоты на хроматограммах раствора стандартного образца должно быть не менее 2000 теоретических тарелок;

- относительное стандартное отклонение площади пика валереновой кислоты на хроматограммах раствора стандартного образца для 6 определений должно быть не более 5,0 %.

На хроматограмме раствора испытуемого образца отмечалось четкое разделение пиков валереновой и ацетоксивалереновой кислот (рис. 2).

Содержание суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту в испытуемых образцах составило от 0,015 до 0,025 % (табл. 2). Полученные результаты согласуются с нормой,

Таблица 2. Сравнение результатов количественного определения действующих веществ в настойке валерианы, полученных двумя методами

Table 2. Comparison of the results of quantitative determination of active ingredients in valerian tincture obtained by two methods

Испытуемый образец Test sample	Спектрофотометрический метод Spectrophotometric method		Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии High performance liquid chromatography method	
	Содержание суммы сложных эфиров карбоновых кислот в пересчете на этиловый эфир валереновой кислоты (не менее 0,3 %) The total content of carboxylic esters, expressed as valerenic acid ethyl ester (not less than 0.3 %)		Содержание суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту (не менее 0,015 %) The total content of sesquiterpenic acids, expressed as valerenic acid (not less than 0.015 %)	
	Результат анализа, % Test result, %	Относительное стандартное отклонение (RSD), % Relative standard deviation (RSD), %	Результат анализа, % Test result, %	Относительное стандартное отклонение (RSD), % Relative standard deviation (RSD), %
1	0,35	0,5	0,015	0,3
2	0,40	0,9	0,025	0,1
3	0,39	1,3	0,022	0,2
4	0,35	0,8	0,020	1,0
5	0,38	1,5	0,017	0,2
6	0,45	1,1	0,019	0,1
7	0,23	1,9	0,009	0,1

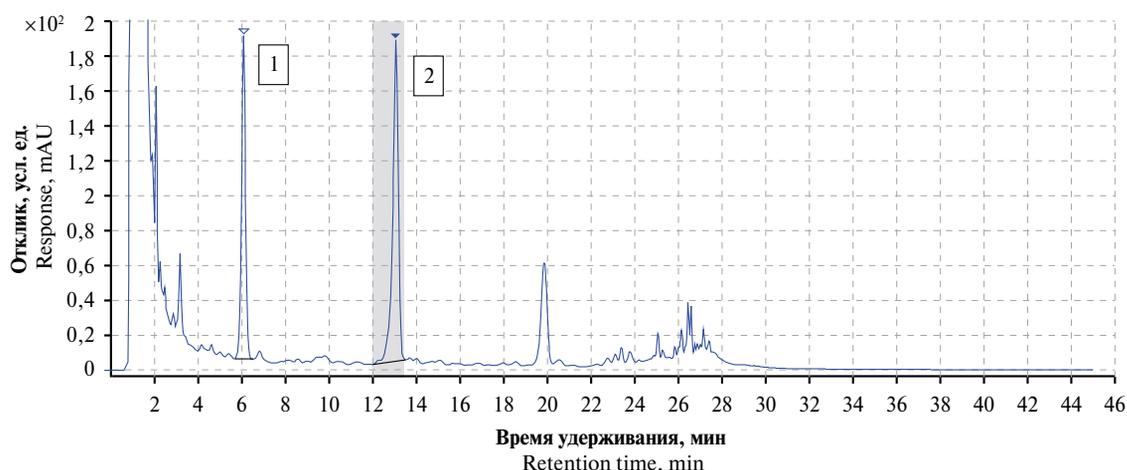


Рис. 2. Хроматограмма испытуемого раствора валерианы настойки. 1 — ацетоксивалереновая кислота; 2 — валереновая кислота. Условия анализа: колонка Nucleosil C18 125×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил — раствор фосфорной кислоты концентрированной 5,0 г/л в воде в режиме градиентного элюирования (табл. 1); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 220 нм; температура колонки 25 °С, объем ввода пробы — 10 мкл

Fig. 2. Chromatogram obtained with the valerian tincture test solution. 1 — acetoxivalerenic acid; 2 — valerenic acid. Test conditions: Nucleosil C18 column 125×4.6 mm (5 μm); mobile phase: acetonitrile — 5.0 g/L solution of concentrated phosphoric acid in water in the gradient elution mode (table 1); flow rate 1.0 mL/min; detection at 220 nm; column temperature 25 °C, injection volume — 10 μl

указанной в Европейской фармакопее и Фармакопее США — не менее 0,015 %.

В рамках валидационных исследований была проведена оценка специфичности, линейности, внутрилабораторной прецизионности, правильности, повторяемости. Оценка линейности проводили методом добавок в условиях повторяемости для следующих уровней диапазона методики: 80, 100, 120, 140 и 160 % от нормируемого нижнего значения.

Для приготовления модельных смесей в мерные колбы вместимостью 10 мл помещали по 5 мл настойки валерианы с содержанием суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту — 0,0189 %, добавляли 0,5 % раствор стандартного образца валереновой кислоты в количестве, соответствующем валидируемому диапазону (табл. 2), и доводили спиртом этиловым 70 % до метки. Регистрировали хроматограммы полученных растворов в описанных выше условиях. Зависимость содержания суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту в испытуемом образце (мг/мл) от площади пика валереновой кислоты описывается уравнением $y = 18186x + 127,59$. Квадрат коэффициента корреляции составил 0,9989 (должно быть не менее 0,995), что подтверждает линейность в рассматриваемом диапазоне.

Для оценки правильности определяли степень соответствия между известным истинным значением и значением, полученным по данной методике (отношение найденного содержания суммы сесквитерпеновых кислот к теоретическому содержанию действующих веществ в модельной смеси с добавкой валереновой кислоты). Результаты представлены в таблице 3. Правильность со-

ставляла 98,34–101,70 %, что не выходит за пределы допустимого диапазона (критерий приемлемости 97–103 %).

Сравнение результатов количественного определения действующих веществ в семи образцах настойки валерианы методами спектрофотометрии и ВЭЖХ (табл. 2) позволило установить, что образцы № 1–6 соответствуют установленным нормам независимо от используемого метода анализа.

Несоответствие заявленным требованиям, выявленное в образце препарата № 7 при использовании спектрофотометрического метода анализа, было подтверждено методом ВЭЖХ.

Таким образом, предложенная методика позволяет получить достоверные и воспроизводимые результаты, является высокочувствительной, селективной и может быть использована для количественного определения действующих веществ в валерианы настойке вместо методики спектрофотометрического анализа.

По результатам проведенного исследования предлагаем установить предварительное значение нормы содержания суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту, определяемое методом ВЭЖХ, на уровне «не менее 0,015 %».

ВЫВОДЫ

1. Предложен современный подход к стандартизации настойки валерианы по показателю «Количественное определение».

2. Разработана методика определения суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту методом ВЭЖХ для стандартизации настойки валерианы, которую предлагается включить

Таблица 3. Результаты оценки правильности определения суммы сесквитерпеновых кислот методом ВЭЖХ

Table 3. The results of assessing the trueness of determination of the total content of sesquiterpenic acids by HPLC

Модельная смесь Model mixture	Уровень диапазона методики, % Method range, %	Количество аналита в испытуемом растворе, мг/10 мл Amount of analyte in the test solution, mg/10 mL	Аликвота раствора СО валереновой кислоты, мл Aliquot of the valerenic acid RS solution, mL	Теоретическое содержание действующего вещества в испытуемом растворе (с добавкой СО), мг/мл Predicted content of the active ingredient in the test solution (spiked with the RS), mg/mL	Площадь пика валереновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора Area of the peak due to valerenic acid in the chromatogram obtained with the test solution	Найдено, мг/мл Results, mg/mL	Правильность, % Trueness, %
1	80	0,945	1,1	0,151	2861	0,149	98,34
2					2857	0,148	
3	100		1,9	0,189	3577	0,190	100,26
4					3570	0,189	
5	120		2,6	0,227	4292	0,230	100,66
6					4290	0,227	
7	140		3,4	0,265	5008	0,271	101,70
8					5003	0,268	
9	160		4,2	0,302	5723	0,305	100,50
10					5720	0,302	

Примечание. СО — стандартный образец.
Note. RS — reference standard.

в нормативную документацию на препарат вместо методики спектрофотометрического анализа.

3. По результатам проведенной оценки пригодности хроматографической системы установлено, что разработанная методика пригодна, воспроизводима и позволяет получать достоверные результаты.

4. Разработанная методика ВЭЖХ отвечает требованиям сквозной стандартизации, отличается большей специфичностью и селективностью, так как для расчетов учитываются пики валереновой и ацетоксивалереновой кислот, используется стандартный образец валереновой кислоты.

5. Установлены нормы содержания суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту в условиях разработанной методики ВЭЖХ — не менее 0,015 %.

6. Методика может быть рекомендована для включения в проект фармакопейной статьи «Валерианы настойка» для Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Аляутдин РН, Романов БК, Гусейнов МД, Лопатин ПВ, Зилфикаров ИН. Экспериментальная скрининговая оценка стресспротекторного действия фитопрепаратов. *Российский медицинский журнал*. 2008;(3):29–33. [Alyautdin RN, Romanov BK, Guseynov MD, Lopatin PV, Zilfikarov IN. Experimental screening evaluation of the stressprotective effect of phytopreparations. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation*. 2008;(3):29–33 (In Russ.)]
- Быков ВА, ред. *Атлас лекарственных растений России*. М.: ВИЛАР; 2006. [Bykov VA, ed. *Atlas of medicinal plants of Russia*. Moscow: VILAR; 2006 (In Russ.)]
- Коновалова ОА, Шейченко ВИ, Рыбалко КС. О химическом составе корневищ с корнями *Valeriana wolgensis* из цикла *Valeriana officinalis* L. *Химия природных соединений*. 1991;(1):141–3. [Konovalova OA, Sheychenko VI, Rybalko KS. On the chemical composition of rhizomes with roots *Valeriana wolgensis* from the cycle *Valeriana officinalis* L. *Khimiya prirodnykh soedineniy = Chemistry of Natural Compounds*. 1991;(1):141–3 (In Russ.)]
- Фурса НС, Шкроботко ПЮ, Караванова ЕН, Забелина СК, Колосова ОА, Макарова ДЛ, Домрачев ДВ. Изучение состава эфирного масла свежих и высушенных корневищ с корнями валерианы лекарственной. *Фармация*. 2013;(8):7–9 [Fursa NS, Shkrobot'ko PYu, Karavanova EN, Zabelina SK, Kolosova OA, Makarova DL, Domracheev DV. Investigation of the composition of essential oil in the fresh and dried setwell (*Valeriana officinalis*) rhizomes and roots. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2013;(8):7–9 (In Russ.)]
- Антонова НП, Шефер ЕП, Прохвятилова СС, Семенова НЕ, Легонькова УС. Стандартизация действующих веществ валерианы лекарственной в растительном сырье и таблетках экстракта валерианы. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2014;(2):55–9. [Antonova NP, Shefer EP, Prokhwatylowa SS, Semanova NE, Legon'kova US. Standardization of active substances of valeriana medicinal in plant raw material and tablets of valeriana extract. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya*. 2014;(2):55–9. (Antonova NP, Shefer EP,

Prokhvatilova SS, Semenova NE, Legon'kova US. Standardization of *Valeriana officinalis* active ingredient in herbal raw material and in Valerian tablets. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2014;(2):55–9 (In Russ.)]

6. Хишова ОМ, Дубашинская НВ, Адаменко ЯЮ. Технология получения и оценка качества жидкого экстракта корневищ

с корнями валерианы. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2016;15(1):99–105 [Khishova OM, Dubashinskaya NV, Adamenko YaYu. Production technology and quality assessment of liquid extract of Valerian rhizomes and roots. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Vestnik of Vitebsk State Medical University*. 2016;15(1):99–105 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Антонова Наталья Петровна, канд. биол. наук. *Natalia P. Antonova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-7818-5303>

Шефер Елена Павловна, канд. фарм. наук. *Elena P. Shefer*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8389-4799>

Калинин Артем Михайлович. *Artem M. Kalinin*. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-4980-3248>

Семенова Наталья Евгеньевна. *Natalia E. Semenova*. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6787-0647>

Прохватилова Светлана Степановна, канд. фарм. наук. *Svetlana S. Prokhvatilova*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-3278-1994>

Моргунов Игорь Михайлович. *Igor M. Morgunov*. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-3907-3456>

Статья поступила 12.11.2018

После доработки 21.05.2019

Принята к печати 19.11.2019

Article was received 12 November 2018

Revised 21 May 2019

Accepted for publication 19 November 2019

Опыт проведения клинико-лабораторных исследований в доклинической оценке безопасности лекарств (часть 2: биохимические и патоморфологические исследования)

А. В. Сорокина*, С. В. Алексева, Н. В. Еремина, А. Д. Дурнев

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт фармакологии имени В. В. Закусова»,
Балтийская ул., д. 8, Москва, 125315, Российская Федерация

Резюме. Исследования хронической токсичности представляют собой неотъемлемую часть общей токсикологической оценки потенциальных лекарственных средств. Биохимические исследования крови и мочи при этом позволяют описать общую картину состояния животного, проследить динамику изменения лабораторных показателей — маркеров повреждений органов при многократном введении препарата как для группы животных, так и индивидуально. Патоморфологические исследования органов и тканей позволяют на клеточном уровне представить характер повреждений. В ходе системного анализа полученных данных возможно однозначно выявить системы организма, наиболее подверженные токсическому действию препарата, а также оценить степень воздействия и обратимость эффектов. Учитывая высокую ценность получаемой фармакологической информации, необходимо уделять особое внимание надлежащему методологическому выполнению всех этапов подготовки и проведения упомянутых исследований, а также соответствующему анализу и интерпретации данных. Цель работы — методическое обобщение опыта проведения биохимических и патоморфологических исследований, накопленного в лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» при проведении хронических токсикологических экспериментов.

Ключевые слова: доклинические токсикологические исследования; хроническая токсичность; клинико-лабораторные исследования; биохимические исследования; патоморфологические исследования

Для цитирования: Сорокина АВ, Алексева СВ, Еремина НВ, Дурнев АД Опыт проведения клинико-лабораторных исследований в доклинической оценке безопасности лекарств (часть 2: биохимические и патоморфологические исследования). *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(4):272–279. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-272-279>

***Контактное лицо:** Сорокина Александра Валериановна; alex-mike5475@mail.ru

Summary of Clinical Laboratory Studies Performed During Preclinical Safety Evaluation of Medicinal Products (Part II: Biochemical and Pathomorphological Studies)

A. V. Sorokina*, S. V. Alekseeva, N. V. Eremina, A. D. Durnev

Zakusov Institute of Pharmacology,
8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russian Federation

Abstract. Chronic toxicity studies are an integral part of the overall toxicological evaluation of drug candidates. Biochemical studies of blood and urine serve to describe the general picture of the animal's condition and to trace the dynamics of laboratory markers of organ damage after repeated administration of the drug — both for a group of animals, as well as individually. Pathomorphological studies of organs and tissues make it possible to understand the nature of damage at the cellular level. A systemic analysis of the data obtained allows for accurate identification of the body systems that are most susceptible to the toxic effect of the drug, as well as for assessment of the degree of impact and the reversibility of effects. Considering the great importance of the obtained pharmacological information, it is necessary to pay special attention to proper methodological implementation of all the stages of preparation and performance of the mentioned studies, as well as to proper analysis and interpretation of the data. The aim of the paper was to summarise the methodology of biochemical and pathomorphological studies based on the experience obtained in the Drug Toxicology Laboratory of the Federal State Budgetary Institute «Zakusov Institute of Pharmacology» when conducting chronic toxicity studies.

Key words: preclinical toxicology studies; chronic toxicity; clinical laboratory studies; pathomorphological studies; biochemical studies

For citation: Sorokina AV, Alekseeva SV, Eremina NV, Durnev AD. Summary of clinical laboratory studies performed during preclinical safety evaluation of medicinal products (part II: biochemical and pathomorphological studies). *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(4):272–279. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-272-279>

***Corresponding author:** Aleksandra V. Sorokina; alex-mike5475@mail.ru

Доклиническое изучение безопасности — сложная многоплановая процедура, включающая в себя комплекс исследований систем и органов на различных уровнях организации. Итоговые результаты таких исследований подвергаются перекрестному сопоставлению и признаются значимыми только при совпадении частных заключений по каждому фрагменту исследований с обязательным учетом возможного влияния фармакологических эффектов, присущих изучаемому веществу.

Данные, получаемые в ходе клинико-лабораторных исследований, в частности гематологических, биохимических и патоморфологических, представляют особую ценность при составлении полной картины токсического действия препарата при его многократном введении, поскольку позволяют идентифицировать органы-мишени воздействия препарата, оценить степень и обратимость эффектов и, соответственно, спрогнозировать возможные нежелательные явления при клинических исследованиях у людей. Поскольку совокупность полученных в вышеупомянутых исследованиях данных при корректной их интерпретации вносит существенный вклад в формирование соотношения «риск—польза» при обсуждении программы развития препарата, необходимо обеспечивать качество получаемых данных на всех этапах проведения исследования¹.

Цель работы — методическое обобщение опыта проведения биохимических и патоморфологических исследований, накопленного в лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при проведении хронических токсикологических экспериментов.

ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОМАТЕРИАЛА

Основные аспекты корректной процедуры забора крови у лабораторных животных отражены в статье, опубликованной авторами ранее [1]. В настоящем разделе представлены особенности надлежащего проведения биохимических и патоморфологических исследований.

Приготовление образцов для биохимического анализа

Объем исследования определяется задачами эксперимента, при анализах обязательно использование сертифицированного и поверенного оборудования².

Пробы для клинико-биохимического анализа отбирают в пробирки для отделения сыворотки/плазмы. Пробирки несколько раз переворачивают для полного контакта с клот-активатором/антикоагулянтом. Пробы выдерживают в течение 10–15 ми-

нут при комнатной температуре, после чего их центрифугируют для отделения сыворотки/плазмы в соответствии с условиями, указанными производителем пробирки. Сыворотку/плазму удаляют с помощью полипропиленовой пипетки и помещают в предварительно промаркированную полипропиленовую пробирку с завинчивающейся крышкой. Если сыворотка/плазма должна храниться для последующего анализа, то пробу следует немедленно заморозить при температуре ниже -15°C .

Сбор мочи

Минимальный объем анализов мочи в токсикологическом эксперименте предполагает определение суточного диуреза, кислотности, плотности, содержания белка, глюкозы, кетонов, мочевины и креатинина, а также микроскопическую оценку осадка.

Метод сбора и хранения образцов мочи может повлиять на результаты, поэтому свежий образец всегда более предпочтителен для анализа, если не требуется измерение суточного объема мочи. Исследование общего объема, цвета, мутности, кислотности и плотности рекомендуется проводить непосредственно после сбора мочи.

Методы сбора мочи, зачастую рутинно используемые в токсикологических исследованиях, примитивны и плохо поддаются стандартизации, поэтому анализы часто проводятся простыми качественными методами с использованием индикаторных полосок.

Для проведения более точных количественных анализов мочу собирают с помощью специальных (метаболических) клеток. В случае если необходимо собрать определенный по объему образец мочи (например, 12-, 16- или 24-часовой период), для сохранения биоматериала рекомендуется обкладывать льдом контейнеры для сбора мочи или использовать консервант.

Для получения свежей мочи используют эвтаназию или специальные манипуляции с животными, подробно описанные в специальной литературе [2, 3].

Отбор и подготовка тканей для микроскопического исследования

При выборе тканей для микроскопической оценки следует ориентироваться на нормативные документы³. Общий список органов и тканей представлен в таблице 1.

Плановое патологоанатомическое вскрытие при токсикологических исследованиях должно проводиться в течение 5–10 минут после эвтаназии животного. Необходимо тщательно осматривать

¹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2012.

² Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2013.

³ Макаров ВГ, Макарова МН, ред. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Справочник. СПб.: ЛЕМА; 2013.

³ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2012.

Таблица 1. Перечень органов и тканей для микроскопического исследования

Table 1. Organs and tissues for microscopic examination

Наименование системы органов, тканей	Наименование органа
Органы нервной системы	Головной мозг, спинной мозг
Органы системы кровообращения	Сердце, аорта
Органы дыхательной системы	Легкие, трахея
Органы системы пищеварения	Пищевод, желудок, кишечник (тощая, толстая кишка), печень, поджелудочная железа
Органы выделительной системы	Почки, мочевой пузырь
Органы репродуктивной системы	Семенники, придатки семенников, яичники, матка
Эндокринная система органов	Надпочечники, щитовидная железа с участками паращитовидной железы, островки Лангерганса поджелудочной железы
Органы иммунной системы	Селезенка, тимус, лимфатические узлы
Опорно-двигательный аппарат	Кости, скелетные мышцы
Ткани, примыкающие к местам введения препаратов	Участки кожи с подкожной клетчаткой, скелетной мускулатуры, периферических кровеносных сосудов (при парентеральном введении), органов системы пищеварения (при пероральном введении)

каждый орган до помещения его в емкость с фиксирующим раствором. Такой алгоритм действий позволит уже на этапе патологоанатомического вскрытия выявить все макроскопические изменения органов и тканей.

Даже небольшое отклонение от стандартного протокола, будь то патологоанатомическое вскрытие, отбор и фиксация образцов, их обезвоживание, проводка, заливка и дальнейшая подготовка к микроскопии, на любом этапе может привести к порче материала и, как следствие, к ошибочным выводам⁴.

Отбор органов и тканей. В ходе проведения патологоанатомического вскрытия органы и ткани экспериментальных животных визуализируют, отделяют от тушки, взвешивают, разрезают остроконечным скальпелем и снова визуализируют по поверхности разреза, помещают в емкость с фиксирующей жидкостью⁵. Для фиксации в формалине отбирают фрагменты тканей из типичных пораженных тканей, а при наличии изменений — участки со здоровой тканью⁶.

При отборе органов дыхательной системы, как правило, проводят плавательную пробу легких (проба Галена)⁷. Иногда легкие и трахею подвергают перфузии путем введения 10 % забуференного формалина (примерно 4–8 мл для крыс) до полного заполнения легких.

При отборе органов системы выделения поверхности почек визуализируют. Затем левые почки

рассекают по сагиттальной плоскости, а правые — по фронтальной и фиксируют.

В случае, когда патологоанатомическое вскрытие проводят после перорального введения исследуемого препарата, для макроскопической оценки состояния слизистой пищевода, желудка и кишечника их рассекают ножницами по всей толщине, промывают и визуализируют. После осмотра органы желудочно-кишечного тракта фиксируют.

Если патологоанатомическое вскрытие проводят после парентерального введения исследуемого препарата, то органы желудочно-кишечного тракта подвергают перфузии 10 % нейтральным забуференным формалином, что положительно влияет на качество и скорость фиксации слизистой. Затем помещают в фиксирующий раствор.

Фиксация образцов тканей. Фрагменты органов и тканей, отобранные в ходе патологоанатомического вскрытия для дальнейшего микроскопического исследования, необходимо зафиксировать с целью закрепления тканевых структур в том состоянии, в каком они находились в момент погружения в фиксирующий раствор, а также предохранения их от разрушения⁸.

При фиксации важно соблюдать объемные соотношения ткани и фиксатора. Объем фиксирующего раствора должен как минимум в 20 раз (лучше в 40 раз) превышать объем всех фиксируемых объектов. Малый объем фиксирующего раствора может заметно снизить качество получаемых

⁴ Jacobson-Kram D, Keller KA, eds. Toxicological testing handbook: principles, applications, and data interpretation. Informa Healthcare USA; 2006. Haschek WM, Wallig MA, Rousseaux C, eds. Fundamentals of toxicologic pathology. Elsevier; 2010.

⁵ Пальцев МА, Коваленко ВЛ, Аничков НМ. Руководство по биопсийно-секционному курсу: Учебное пособие. М.: Медицина; 2002.

⁶ Hodgson E, ed. A textbook of modern toxicology. John Wiley & Sons; 2004.

⁷ Жаров АВ, Иванов ИВ, Стрельников АП. Вскрытие и патоморфологическая диагностика болезней животных. Учебное пособие для высших учебных заведений. М.: КолосС; 2003.

⁸ Меркулов ГА. Курс патологистологической техники. Л.: Медицина; 1969.

микропрепаратов. Для предотвращения прилипания фрагментов тканей к стенкам и дну в контейнер кладут кусок скомканной марли или вату. Прилипшие объекты плохо фиксируются и могут стать непригодными для дальнейшей работы.

Температура, при которой проводится фиксация, в большинстве случаев не должна превышать 18–20 °С. Более высокая температура, например 37–40 °С (термостат), хотя и ускоряет диффузию фиксирующей жидкости, может провоцировать процессы аутолиза в глубине объекта.

Для того чтобы обеспечить полную фиксацию, толщина образцов, иссекаемых из твердых тканей, таких как печень и селезенка, не должна превышать 0,5 см. Если фиксирующая жидкость после погружения в нее образцов тканей мутнеет или изменяет свой цвет из-за окрашивания кровью, то ее непременно заменяют свежей. Однажды использованный фиксатор не употребляют повторно.

Многие морфологи употребляют сложные фиксирующие смеси, однако вопрос о качестве и составе фиксатора решается практически каждым экспериментатором в зависимости от задач исследования. Для различных видов тканей рекомендовано выбирать различные фиксирующие растворы, такие как 10 % забуференный формалин, 4 % параформальдегид, этиловый спирт, жидкости Буэна, Карнуа, Орта и другие⁹. Фиксирующие растворы применяются в строгом соответствии со стандартными операционными процедурами, утвержденными для конкретной лаборатории.

Подготовка к микротомированию, микротомирование, окраска. Иссечение тканей, извлеченных из фиксирующих растворов, проводят в вытяжном шкафу. Во время иссечения необходимо захватывать все отмеченные при патологоанатомическом вскрытии измененные или поврежденные участки тканей, чтобы микропрепараты получились в полной мере репрезентативными. Повреждения или аномалии, обнаруженные на этапе иссечения, отражаются в соответствующем разделе протокола. Образцы тканей помещаются в предварительно промаркированные кассеты.

Для дальнейшего микротомирования фиксированные образцы необходимо уплотнить. Для этого используют заливку в парафин (парафиноподобные смеси), целлоидин или заморозку. Перед заливкой в парафин образцы тщательно обезживают, поэтапно проводят через специальные жидкости, подготавливающие ткани к пропитке парафином (хлороформ, ксилол, изопропиловый спирт и другие), затем пропитывают парафином и заливают в гистологические кассеты.

Для тканей, заливаемых парафином, в гистологических лабораториях широко используются

полностью автоматизированные приборы для обработки тканей¹⁰. В качестве реагента, подготавливающего ткани к пропитке парафином, в последнее время широкое распространение получил изопропанол. Протокол обработки образцов перед заливкой должен быть специфичным для каждого вида животных и/или размера органов и типа ткани. Температура парафина, изменение реагента, номер исследования, количество кассет и дата обработки должны быть задокументированы. Схема заливки ткани должна учитывать размер и консистенцию образца и быть направлена на максимальное восстановление тканей для последующей микроскопической оценки.

После заливки образцов парафином производится микротомирование. Микротомирование осуществляется с помощью современных микротомов с использованием одноразовых лезвий. Толщина срезов, как правило, варьирует от 4 до 6 мкм. Срезы помещают на тонкие предметные стекла с адгезивным покрытием. После просушки микропрепараты помещаются в лотки, сосуды Хеллендахаля или другие емкости для окрашивания. Окраску ведут общими методами (например, гематоксилин-эозином) или иначе в соответствии с задачами исследования [4]. Реагенты и красители, используемые во время окрашивания, должны регулярно обновляться. Окрашенные микроскопические препараты покрывают монтирующими средами (Канадский бальзам, Био Маунт, Маунт Лейка и др.), а затем покровными стеклами соответствующего размера и размещают на лотки/площадки для сушки и контроля маркировки. Готовые гистопрепараты микроскопируют в проходящем свете.

ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Биохимические исследования

Сыворотка/плазма крови. Основная функция биохимического анализа сыворотки/плазмы в доклинических исследованиях лекарственных средств заключается в определении потенциальных органов-мишеней токсического действия препарата и оценке времени действия и обратимости этого повреждения без биопсии соответствующих тканей/органов или некропсии. Гистопатологические исследования подтверждают клинические и биохимические признаки патологии.

Основные показатели биохимического анализа крови, определяемые в токсикологических исследованиях: глюкоза, альбумин, общий белок, аланинаминотрансфераза, аспаргатаминотрансфераза, креатинин и мочевины¹¹. В исключительных случаях дополнительно определяют калий, натрий, кальций, хлориды, фосфор, холестерин, а также

⁹ Сапожников АГ, Доросевич АЕ, ред. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство. Смоленск: САУ; 2000.

¹⁰ Rolls GO. 101 steps to better histology — a practical guide to good histology practice. Leica Microsystems; 2008.

¹¹ Камышников ВС, ред. Методы клинических лабораторных исследований. М.: МЕДпресс-информ; 2016.

некоторые маркеры повреждения печени, такие как щелочная фосфатаза, желчные кислоты, гамма-глутамилтрансфераза, сорбитдегидрогеназа и 5'-нуклеотидаза (табл. 2)¹².

В некоторых случаях, когда сразу несколько органов содержат достаточно высокое количество одного и того же фермента, но в разных изоферментных формах, повышение его уровня не всегда указывает на конкретный орган-мишень, который подвергается токсическому воздействию. В качестве примеров можно привести лактатдегидрогеназу (печень, мышцы, сердце), аспартатаминотрансферазу (печень, мышцы, эритроциты) и креатинфосфокиназу (печень, мышцы)¹³.

Моча. Показатели, измеряемые при анализе мочи, — суточный диурез, кислотность, плотность, белок, глюкоза, кетоны, мочевины и креатинин, а также микроскопическая оценка осадка — в основном характеризуют почечную функцию и могут помочь при идентификации химической индуцированной нефротоксичности (табл. 3)¹⁴ [5].

Микроскопический анализ

Оценка клеточной морфологии органов и тканей является основополагающей в токсикологическом эксперименте, поскольку позволяет выявить повреждения, определить их биологическое значение и основные характеристики. Для адекватной

Таблица 2. Основные показатели биохимического анализа крови и их описание

Table 2. Key biochemistry parameters and their description

Показатель	Описание	Трактовка результатов
Глюкоза	Основной экзо- и эндогенный субстрат энергетического обмена	Содержание глюкозы в сыворотке определяется сложным взаимодействием гормонов, таких как глюкагон, инсулин, кортизол и адреналин. Забор крови для определения глюкозы следует по возможности осуществлять натощак. Причины повышенной концентрации глюкозы в сыворотке крови: забор крови после приема корма животными, сахарный диабет, гиперадренкортицизм, состояние агонии, воздействие экзогенных глюкокортикоидов и морфина, а также длительный стресс. Снижение концентрации глюкозы может быть результатом употребления этанола, печеночной недостаточности, дефицита гормона роста, глюкокортикоидов и глюкагона. В результате гипогликемии могут возникнуть тяжелые и, возможно, необратимые дисфункции центральной нервной системы. Клинические признаки гипогликемии включают нарушения поведения экспериментальных животных, атаксию и судороги, которые могут прогрессировать вплоть до терминального состояния и последующей гибели
Белки крови		В плазме идентифицируются около трехсот белков. За исключением белковых гормонов и иммуноглобулинов большинство белков плазмы синтезируется в печени с индивидуальной скоростью и выполняет функции коллемементарных факторов, факторов свертывания, анионов в кислотно-щелочном балансе и переносчиков для витаминов, гормонов, жиров, свободного гемоглобина и свободного билирубина. Как правило, в плазме измеряют общий уровень белка и альбумин
Альбумин	Самый распространенный белок плазмы крови, основной фактор, определяющий онкотическое давление плазмы	Как правило, общая концентрация сывороточных белков находится в прямой зависимости от концентрации сывороточного альбумина. Хотя гипоальбуминемия наблюдается только при обезвоживании, гипергаммаглобулинемия, гиперфибриногенемия, гипоальбуминемия (и гипопроteinемия) широко распространены при многих болезненных состояниях и могут являться результатом нарушения синтеза (заболевания печени), увеличения катаболизма (повреждение тканей), снижения абсорбции (пониженное кормление), потери белка (гломерулонефрит, энтеропатия с потерей белка, ожог кожи) или измененный распределения (асцит)
Аминотрансферазы: аланинаминотрансфераза (АЛТ) и аспартатаминотрансфераза (АСТ)	АЛТ и АСТ катализируют перенос аминокетильной группы от аланина или аспартата к оксоглутарату с образованием L-глутамата. Присутствуют в цитозоле гепатоцитов и при изменении проницаемости плазматической мембраны попадают во внеклеточную жидкость, таким образом являясь индикаторами повреждения гепатоцитов	У лабораторных животных АЛТ является специфическим индикатором повреждения или заболевания печени, в то время как АСТ содержится в печени и мышцах, в том числе в миокарде. Эти ферменты высвобождаются из цитозоля клеток при изменении проницаемости плазматической мембраны, что может быть результатом пониженной подачи кислорода в печень, прямого воздействия токсинов, лекарственных препаратов или химических веществ, а также воспаления и/или жирового перерождения. В целом, увеличение уровня АЛТ при повреждении или заболевании печени более выражено, чем увеличение уровня АСТ, что обусловлено, в частности, присутствием некоторого количества АСТ в митохондриях гепатоцитов. Кроме того, повышенный уровень АЛТ сохраняется дольше, чем уровень АСТ (период полураспада обоих ферментов в плазме крови составляет от 2 до 4 дней). Повышение уровня АЛТ и АСТ прямо пропорционально количеству поврежденных гепатоцитов, что, однако, не дает информации об обратимости изменений. Это также верно для повышения уровня АСТ при поражении мышц или повреждении миокарда

¹² Williams PL, James RC, Roberts SM, eds. Principles of toxicology: environmental and industrial applications. John Wiley & Sons; 2000. Gad SC, ed. Animal models in toxicology. Taylor & Francis Group; 2006.

¹³ Карпищенко АИ, ред. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012.

¹⁴ Там же.

Показатель	Описание	Трактовка результатов
Мочевина	Мочевина является основным азотсодержащим метаболитическим продуктом катаболизма белков и синтезируется в печени. Небольшое количество мочевины также абсорбируется из толстого кишечника	Путем выведения мочевины является почечная экскреция. Процесс выведения мочевины активизируется, если ее концентрация в фильтрате слишком высока. В зависимости от скорости клубочковой фильтрации (прямо пропорционально) мочевина пассивно диффундирует водой из канальцевого просвета обратно в кровь. Предпочтительным методом анализа азота мочевины в сыворотке крови является метод уреазы с глутаматдегидрогеназой (парная ферментная система), с помощью которого измеряется уменьшение оптической плотности в результате реакции глутаматдегидрогеназы. Увеличение азота мочевины в крови характеризуется как преренальная, ренальная и постренальная азотемия. Причиной увеличения концентрации азота мочевины в крови при преренальной азотемии является увеличение катаболизма белков (например, повреждение тканей, лихорадка) или снижение почечной перфузии (например, обезвоживание, шок, сердечно-сосудистые нарушения), при этом уровень сывороточного креатинина остается нормальным. Ренальная азотемия возникает, когда не функционируют примерно 75 % нефронов, при этом сывороточный креатинин и азот мочевины увеличиваются. Затруднения с оттоком мочи приводят к постренальной азотемии, при которой также наблюдается увеличение обоих показателей, однако увеличение азота мочевины непропорционально выше
Креатинин	Креатинин образуется в результате спонтанного неферментативного превращения свободного креатина в мышцах	Приблизительно от 1 до 2 % мышечного креатина ежедневно превращается в креатинин, и количество эндогенного креатинина пропорционально мышечной массе. Уровень креатинина наряду с уровнем азота мочевины в крови может свидетельствовать о заболеваниях почек, непроходимости мочевыводящих путей. Он свободно фильтруется через клубочки, однако небольшое количество поглощается почечными канальцами, а также выделяется проксимальными канальцами. Повышение уровня креатинина в крови возникает при снижении клубочковой фильтрации. Уровень креатинина также повышается при пониженной почечной перфузии. Клиренс креатинина также измерим и считается точным показателем скорости клубочковой фильтрации

Таблица 3. Основные показатели, определяемые при анализе мочи, и их описание

Table 3. Key parameters of urine analysis and their description

Показатель	Трактовка результатов
pH	Значение pH в моче не отражает нормальную физиологическую ситуацию, так как растворенный диоксид углерода (CO ₂) рассеивается в период сбора, что приводит к повышению pH. Если значение pH выходит за пределы диапазона 6,0–7,0, то изменения, скорее всего, связаны с методом отбора проб
Глюкоза	Увеличение глюкозы в моче может быть связано с сахарным диабетом, обширной травмой, воздействием экзогенных стероидов, инфекциями или феохромоцитомой (опухоль надпочечников)
Кетоны	Наличие кетонов (ацетона и ацетоуксусной кислоты) определяется в моче только качественно, его связывают с сахарным диабетом, длительным голоданием, длительной рвотой или низкоуглеводной диетой
Плотность	Шерсть, перхоть, экскременты и пыль, которые иногда встречаются в моче вследствие нарушения методики отбора проб, ложно увеличивают ее плотность. Этот показатель является грубым индикатором концентрирующей способности почек (осмотическое давление) и может изменяться при некоторых типах нефротоксичности
Микроскопическое исследование	Микроскопическое исследование осадка мочи позволяет обнаруживать эпителиальные клетки, бактерии, цилиндры, эритроциты, лейкоциты и кристаллы. Необходимо учитывать, что при отсутствии консерванта наблюдается рост бактерий в моче в период ее сбора и хранения. Обнаружение цилиндров в осадке мочи свидетельствует о поражении почечных канальцев. Кристаллы служат сигналом риска возникновения камней в почках и/или мочевом пузыре. Обнаружение эритроцитов в осадке мочи свидетельствует о повреждении слизистой оболочки мочевого пузыря или уретры. Лейкоциты появляются в осадке мочи в случаях воспалительных процессов различного генеза в почках, мочевом пузыре, мочеточнике или уретре

оценки макро- и микроскопической картины следует различать изменения, вызванные исследуемым препаратом, от вторичных изменений, спонтанных заболеваний, посмертных изменений и нормальных биологических вариаций¹⁵.

В исследованиях краткосрочной токсичности микроскопический анализ используется для выявления органов-мишеней, общей токсичности препарата и внесения ясности в механизм действия исследуемого препарата. Во многих случаях эта

¹⁵ Афанасьев ЮИ, Кузнецов СЛ, Юрина НА. Гистология, цитология и эмбриология. М.: Медицина; 2012. Саркисов ДС, Перов ЮЛ, ред. Микроскопическая техника. Руководство для врачей и лаборантов. М.: Медицина; 1996. Derelanko MJ, Hollingek MA, eds. Handbook of Toxicology. CRC Press LLC; 2002.

Таблица 4. Основные референсные параметры биохимических показателей крови для мышей, крыс и кроликов

Table 4. Main biochemical reference values for mice, rats and rabbits

Показатель, единицы измерения	Мыши	Крысы	Кролики
Глюкоза, мг/дл	81–165	100–175	100–160
Общий белок, г/дл	4,0–6,0	♂6,2–7,8 ♀6,5–8,5	5,4–6,6
Альбумин, г/дл	2,5–4,2	♂3,3–4,2 ♀3,5–4,7	3,8–5,0
Аланинаминотрансфераза (АЛТ), МЕ/л	25–100	10–50	25–70
Аспаратаминотрансфераза (АСТ), МЕ/л	64–180	45–100	20–25
Мочевина, мг/дл	15–35	12–20	10–20
Креатинин, мг/дл	0,2–0,8	0,3–0,9	1,0–1,6

информация используется в подборе дозы для более детальных и продолжительных исследований.

В продолжительных исследованиях гистолог должен уделить внимание реакциям тканей экспериментальных животных в сравнении с контрольными животными. Также необходимо отличать изменения, вызванные воздействием испытуемого препарата, от спонтанных изменений под влиянием окружающей среды, возрастных, половых, сезонных и других естественных колебаний¹⁶ [6].

Различия между прямыми и косвенными воздействиями должны определяться путем интеграции всей имеющейся информации, полученной с помощью гематологических, клинико-биохимических методов, а также методов морфологии и гистологии.

Референсные значения

На значения показателей биохимического исследования крови влияет ряд переменных, среди которых вид, пол, возраст, условия содержания в клетке, условия окружающей среды, рацион, тощачный статус — натощак или после приема корма, методика отбора пробы крови, использование анестезии, методика анализа, используемый анализатор и др.¹⁷ В этой связи подчеркнем важность проведения всех манипуляций с животными испытуемых и контрольных групп в одинаковых условиях эксперимента.

В таблице 4 представлены диапазоны референсных значений биохимических показателей крови для животных, наиболее часто использующихся в токсикологических экспериментах возрастов: 20 недель для мышей и крыс и 5 месяцев для кроликов¹⁸. Как правило, влияние половой принадлежности либо минимально, либо неочевидно при изучении клинической патологии лабораторных животных. Там, где существуют значительные различия, представлены значения для обоих полов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Надлежащее проведение доклинического исследования хронической токсичности потенциальных лекарственных средств является крайне важным, поскольку данные, полученные в результате таких исследований, играют определяющую роль при принятии решения о стратегии дальнейшей разработки препарата и планировании его клинических исследований. Показатели, определяющиеся в ходе гематологических, биохимических и патоморфологических исследований, при правильной их интерпретации позволяют выявить органы-мишени токсического действия препарата, оценить динамику и обратимость эффектов, а также предоставить ценную информацию для заключения о соотношении риск-польза. В этой связи особое внимание следует уделять обеспечению качества проведения клинико-лабораторных исследований.

Согласованный анализ данных, полученных с помощью клинических, гематологических и биохимических методов, а также данных патологоанатомического вскрытия и микроскопического анализа органов и тканей экспериментальных животных, описанный в стандартизированной форме, обеспечивает презентацию корректных выводов о доклинической безопасности нового лекарственного средства.

При изучении гематологических показателей и при оценке клинических биохимических параметров специалист должен быть осведомлен о соответствующих методах забора и обработки крови, времени забора, выборе методов, контроле качества выполненных работ и интерпретации результатов тестирования, а также нормальной физиологии лабораторных животных и ее влиянии на клинико-биохимические параметры. В связи с необходимостью разносторонней оценки наблюдаемых явлений

¹⁶ Haschek WM, Wallig MA, Rousseaux C, eds. Fundamentals of Toxicologic Pathology. Elsevier; 2010.

¹⁷ Макаров ВГ, Макарова МН, ред. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Справочник. СПб.: ЛЕМА; 2013.

¹⁸ Jacobson-Kram D, Keller KA, eds. Toxicological testing handbook: principles, applications, and data interpretation. Informa Healthcare USA; 2006.

при изучении хронической токсичности потенциальных лекарственных средств целесообразно включение в исследовательскую команду лекарственных токсикологов разных направлений: специалистов в области физиологии и патологии лабораторных животных, экспериментальных гематологов и биохимиков, патоморфологов и гистопатологов.

В ходе эксперимента лекарственный токсиколог, оценивающий клиническое состояние экспериментальных животных, а также токсиколог-патоморфолог, осуществляющий патологоанатомическое вскрытие, совместными усилиями устанавливают связь между обнаруженными прижизненными и посмертными изменениями. Анализ полученных результатов базируется на данных общей клинической картины, потреблении корма и воды, динамике массы тела, результатах гематологических, биохимических исследований, данных патологоанатомического вскрытия и микроскопического исследования внутренних органов. При этом учитываются контрольные данные, а также данные исторического контроля.

Патологоанатомическое вскрытие должно проводиться специалистом, прошедшим обучение процедуре вскрытия лабораторных животных, выявлению поражений и документированию полученных результатов. Патологоанатом, наблюдающий посмертные изменения, оценивает их биологическую значимость в зависимости от характера патологии и в сочетании с данными клинических

и лабораторных исследований. Важно отличить наблюдаемые общие и клеточные морфологические изменения, вызванные исследуемым препаратом, от вторичной патологии, спонтанной патологии, посмертных расстройств и нормальной биологической изменчивости.

Таким образом, только согласованные действия лекарственных токсикологов, владеющих широким арсеналом методов, обеспечивают сбор материала для описания картины интоксикации, вызванной лекарственным препаратом, и составления итогового заключения, подкрепленного корректными выводами и рекомендациями, для дальнейшей клинической апробации нового лекарственного средства.

В заключение отметим, что, несмотря на токсикологический контекст настоящей статьи, приведенная методология с некоторыми правками может также быть использована в качестве методических рекомендаций в лабораториях, занимающихся проведением доклинических исследований специфической фармакологической активности новых лекарственных препаратов.

Благодарности. Работа проведена без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Сорочкина АВ, Алексеева СВ, Еремина НВ, Дурнев АД. Опыт проведения клинико-лабораторных исследований в доклинической оценке безопасности лекарств (часть 1: гематологические исследования). *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(3):197–206. [Sorokina AV, Alekseeva SV, Eremina NV, Durnev AD. Summary of clinical laboratory studies performed during preclinical safety evaluation of medicinal products (part I: haematological studies). *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(3):197–206. (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-3-197-206>
2. Vap LM, Shropshire SB. Urine cytology: collection, film preparation, and evaluation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2017;47(1):135–49. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.07.009>
3. Kurien BT, Everds NE, Scofield RH. Experimental animal urine collection: a review. *Lab Anim*. 2004;38(4):333–61. <https://doi.org/10.1258/0023677041958945>
4. Slaoui M, Bauchet AL, Fiette L. Tissue sampling and processing for histopathology evaluation. *Methods Mol Biol*. 2017;1641:101–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7172-5_4
5. Wu H, Huang J. Drug-induced nephrotoxicity: pathogenic mechanisms, biomarkers and prevention strategies. *Curr Drug Metab*. 2018;19(7):559–67. <https://doi.org/10.2174/1389200218666171108154419>
6. Taqi SA, Sami SA, Sami LB, Zaki SA. A review of artifacts in histopathology. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2018;22(2):279. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_125_15

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Сорокина Александра Валериановна, канд. биол. наук. *Aleksandra V. Sorokina*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

Алексеева Светлана Витальевна. *Svetlana V. Alekseeva*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-1262-6997>

Еремина Наталья Вахитовна, канд. биол. наук. *Natalia V. Eremina*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7226-5505>

Дурнев Андрей Дмитриевич, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН. *Andrey D. Durnev*, Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>

Статья поступила 02.07.2019

После доработки 27.08.2019

Принята к печати 19.11.2019

Article was received 2 July 2019

Revised 27 August 2019

Accepted for publication 19 November 2019

II Международная научно-практическая конференция «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке»



Научные редакторы журналов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России:
О.Ю. Гойкалова, М.Л. Хрущева, Ю.А. Смирнова.
Фотография предоставлена О.Ю. Гойкаловой

14 ноября 2019 года в Москве состоялась II Международная научно-практическая конференция «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке». Организатором конференции выступил Российский университет дружбы народов (РУДН).

Ключевыми темами мероприятия были:

- международная практика фармацевтической разработки;
- кооперация научно-образовательных учреждений с промышленными предприятиями, индустриальный опыт;
- взаимодействие и гармонизация надлежащих практик;
- фармакогнозия и метаболомика растений в разработке лекарственных средств природного происхождения;
- роль доклинических и клинических исследований в процессе фармацевтической разработки;
- фармаконутрициология: от теории к практике;
- современная аналитика в научных исследованиях и оценке соответствия в фармацевтической и пищевой областях.

В конференции принимали участие ведущие отечественные и зарубежные специалисты, работающие в области разработки и обращения лекарственных средств, представители научно-исследо-

вательских и экспертных организаций в области аналитики и контроля качества продукции фармацевтической и пищевой промышленности.

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России являлся одним из партнеров конференции. В работе заседаний с докладами приняли участие заместитель директора Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств Е.Л. Ковалева, заместитель директора Центра фармакопеи и международного сотрудничества М.Н. Лякина, главный эксперт управления № 2 по эффективности и безопасности лекарственных средств Г.Н. Енгальчева.

Большой интерес участников конференции вызвали журналы ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России («Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения», «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение», «Безопасность и риск фармакотерапии»), которые были представлены сотрудниками отдела редакционно-издательской деятельности учреждения. Научные редакторы — М.Л. Хрущева, О.Ю. Гойкалова, Ю.А. Смирнова ознакомили участников конференции с тематикой материалов журналов, правилами подачи рукописи в редакцию, особенностями процесса публикации.

О.Ю. Гойкалова, М.Л. Хрущева



Участница конференции у стенда ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.
Фотография предоставлена О.Ю. Гойкаловой



**Подписку на журнал можно оформить
в любом отделении «Почты России».**

Подписной индекс издания:
в каталоге Агентства «Роспечать»

**«Издания органов научно-технической
информации» — 57942**

С любого номера
в региональных агентствах подписки:

Урал-Пресс (www.ural-press.ru) — 57942

По объединенному каталогу

«Пресса России» (www.pressa-rf.ru) — T57942

