

Volume 11, No. 2 2021

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 11, №2 2021

Журнал индексируется в российских и международных реферативных и индексных базах данных: Chemical Abstracts (CAS), Embase, Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), его архив включен в базы крупнейших агрегаторов научных ресурсов и библиотек EBSCO, WorldCat, DOAJ, Российская государственная библиотека, Академия Google (Google Scholar), КиберЛенинка и др.

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Пятилетний импакт-фактор РИНЦ – 0,335.

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

Все статьи проходят рецензирование не менее чем 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.

Воспроизведение или использование другим способом любой части издания без ссылки на журнал является незаконным и влечет за собой ответственность, установленную действующим законодательством Российской Федерации.

ВЕДОМОСТИ

НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Рецензируемый научно-практический журнал

Выходит четыре раза в год

Основан в **2005** году

Главный редактор В. В. Косенко

Москва

«Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения» — рецензируемый научно-практический журнал ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Основан в 2005 г. В журнале освещаются передовые достижения по вопросам стандартизации и оценки качества лекарственных препаратов различных групп, разработки и совершенствования методик фармацевтического анализа, методологии экспертизы лекарственных средств, в том числе по установлению их взаимозаменяемости, обсуждаются новые высокотехнологичные методы доклинических и клинических исследований лекарственных средств, рассматриваются актуальные проблемы фармакологии, клинической медицины, вопросы рационального применения лекарственных препаратов на основе принципов персонализированной терапии.

К публикации в журнале принимаются обзорные и оригинальные статьи, краткие сообщения, методические материалы, тематика которых соответствует фармацевтическим и медицинским отраслям науки и следующим научным специальностям:

- Фармацевтическая химия, фармакогнозия, Технология получения лекарств;
- Фармакология, клиническая фармакология;
- Акушерство и гинекология, Эндокринология, Кардиология, Психиатрия, Инфекционные болезни, Нервные болезни, Онкология, Ревматология, Гастроэнтерология.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Косенко Валентина Владимировна, главный редактор, канд. фарм. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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, ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России (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 (Шымкент, Республика Казахстан)

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

Прокофьева Вера Ивановна, д-р фарм. наук, проф., Первый 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., Первый 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 Гуломкодир 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., ФМБА 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. (Москва, Россия)

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

Хохлов Александр Леонидович, член-корр. РАН, 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)

РЕДАКЦИЯ

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

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

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

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

The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products is a peer-reviewed journal covering topics related to applied sciences, which is published by the Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation. The journal was founded in 2005. It covers the latest achievements in standardisation and quality control of various groups of medicines, development and improvement of pharmaceutical test methods, approaches to medicine quality evaluation, including approaches to establishment of medicine interchangeability. The journal discusses new high-tech methods used in preclinical and clinical studies, current pharmacological and clinical medicine issues, rational use of drugs based on personalised medicine principles.

The journal publishes original research articles, reviews, brief communications, and methodical approaches pertaining to one of the pharmaceutical and medical branches of science and following specialist fields:

- Pharmaceutical chemistry, pharmacognosy, Formulation of medicines;
- Pharmacology, clinical pharmacology;
- Obstetrics and gynaecology, Endocrinology, Cardiology, Psychiatry, Infectious diseases, Nervous diseases, Oncology, Rheumatology, Gastroenterology.

EDITORIAL BOARD

Valentina V. Kosenko, Editor-in-chief, Cand. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

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

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.), Golikov Research Clinical Center 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 Kazakhstan Medical Academy (Shymkent, Republic of Kazakhstan)

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 Education (Moscow, Russia)

Anna V. Titova, Dr. Sci. (Pharm.), Information and Methodological 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 Expert 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., Gabrichievsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology (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., Federal Medical Biological Agency (Moscow, Russia)

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

Edwin E. Zvartau, Dr. Sci. (Med.), Prof., Pavlov First Saint Petersburg 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. (Moscow, Russia)

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

Alexander L. Khokhlov, Corr. Member of RAS, 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)

EDITORIAL STAFF

Sergey A. Kalinichev, Editor, Cand. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

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

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

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

ВЕДОМОСТИ НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

СОДЕРЖАНИЕ

Том 11, № 2 2021

РЕДАКТОРСКАЯ КОЛОНКА

«Национальная система экспертизы лекарственных средств должна быть современной» 78
В. В. Косенко

ОБЗОРЫ

Особенности и значимость оценки подгрупп в подтверждающих клинических исследованиях 81
О. И. Басова, И. В. Лысикова, О. Ю. Иванова

Рекомендации по программе клинических исследований лекарственных препаратов
для профилактики и лечения сахарного диабета 94
И. А. Проскурина, Е. В. Петранева, Д. В. Горячев

Определение антраценпроизводных соединений в лекарственных средствах растительного происхождения 104
О. В. Евдокимова, А. В. Бекетова, М. Н. Лякина

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Определение пирогенных примесей в гормональных имплантатах с помощью ЛАЛ-теста 115
Н. П. Неугодова, О. В. Шаповалова, Г. А. Сапожникова, Е. О. Степанюк

Количественное определение арбутина в лекарственных растительных препаратах 121
Н. П. Антонова, С. С. Прохвятилова, Е. П. Шефер, А. М. Калинин, И. М. Моргунов,
Т. А. Голомазова, У. С. Легонькова

Стабильность готовых и приготовленных в лаборатории питательных сред 130
С. И. Кулешова, С. А. Процак, С. А. Лисунова, Г. Ю. Романюк

МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

Вычисление средней смертельной и минимальной смертельной дозы лекарственных средств
с помощью биометрического программного обеспечения CombiStats 135
П. В. Шадрин, Т. А. Батуашвили, Л. В. Симутенко, Н. П. Неугодова

Журнал «Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения» зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.

Свидетельство ПИ № ФС77-53169 от 14 марта 2013 г.

Учредитель: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

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

Подписной индекс в каталоге «Пресса России» — Т57942, в каталоге агентства Урал-Пресс — 57942.

Тираж 100 экз. Цена свободная.

Издатель ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5
Типография ООО «БЕАН»: 603003, Нижний Новгород, ул. Баррикад, д. 1, корп. 5

Подписано в печать: 24.06.2021

<https://www.vedomostinccsmp.ru>, e-mail: vedomosti@expmed.ru

VEDOMOSTI NAUCHNOGO TSENTRA EKSPERTIZY SREDSTV MEDITSINSKOGO PRIMENENIYA

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

CONTENTS

Volume 11, No. 2 2021

EDITOR'S NOTE

"The National System of Expert Evaluation of Medicinal Products Should Be Modern" 78
V. V. Kosenko

REVIEWS

Specific Aspects and Significance of Subgroup Assessment in Confirmatory Clinical Trials 81
O. I. Basova, I. V. Lysikova, O. Yu. Ivanova

Recommendations on the Clinical Trial Programme for Diabetes Medicines 94
I. A. Proskurina, E. V. Petranova, D. V. Goryachev

Determination of Anthracene Derivatives in Herbal Medicines 104
O. V. Evdokimova, A. V. Beketova, M. N. Lyakina

ORIGINAL ARTICLES

Detection of Pyrogens in Hormonal Implants Using the LAL Test 115
N. P. Neugodova, O. V. Shapovalova, G. A. Sapozhnikova, E. O. Stepanyuk

Determination of Arbutin in Herbal Medicinal Products 121
N. P. Antonova, S. S. Prokhvatilova, E. P. Shefer, A. M. Kalinin, I. M. Morgunov, T. A. Golomazova,
U. S. Legon'kova

Stability of Ready-to-Use and Laboratory-Prepared Culture Media 130
S. I. Kuleshova, S. A. Protsak, S. A. Lisunova, G. Yu. Romanyuk

METHODICAL APPROACHES

Calculation of the Median Lethal Dose and Low Lethal Dose Using the CombiStats Biometric Software 135
P. V. Shadrin, T. A. Batuashevili, L. V. Simutenko, N. P. Neugodova

Journal "Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" is registered
in the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications.
Certificate PI No. FS77-53169 dated 14 March 2013

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

Postal address of the founder and editorial office: 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051

Subscription codes are provided in the catalogues of Pressa Rossii—T57942 and Ural-Press agency—57942.
Print run: 100 copies. Free price

Publisher NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114
Printing office BEAN: 1/5 Barricad St., Nizhny Novgorod 603003

Passed for printing: 24 June 2021

<https://www.vedomostincesmp.ru>, e-mail: vedomosti@expmed.ru



Валентина КОСЕНКО:

**«Национальная система
экспертизы лекарственных
средств должна быть
современной»**

С 30 марта 2021 г. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России возглавила Валентина КОСЕНКО, которая с 2004 г. работала в Росздравнадзоре: сначала главой Управления организации госконтроля качества медицинской продукции, а затем заместителем руководителя. Имея колоссальный опыт работы на региональном и федеральном уровнях, Валентина Владимировна дала понять, что она — человек с собственной выработанной годами идеологией и своим взглядом на существующие проблемы, и сразу же взяла очень высокую планку.

Публикуемое интервью — первое, которое она дала в этой должности.

Валентина Владимировна, за многие годы своего существования ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России претерпело достаточно большие изменения. Каковы его основные функции сегодня?

Действительно, за многолетнюю историю своего развития центр прошел через целую череду слияний, реорганизаций, объединений и смены наименований. В результате всех преобразований в Российской Федерации сформировалось уникальное экспертное учреждение, обеспечивающее проведение экспертизы качества, эффективности и безопасности лекарственных средств, включая иммунобиологические лекарственные препараты и биомедицинские клеточные продукты.

В настоящее время основным направлением деятельности, как и прежде, является экспертиза лекарственных средств с целью получения разрешения на проведение клинических исследований и выдачи заключения о возможности государственной регистрации. По результатам экспертизы формируется заключение с оценкой степени безопасности, эффективности и качества препарата. Это заключение направляется в Минздрав России, который на его основе выносит положительное или отрицательное

решение относительно государственной регистрации препарата и вывода его на рынок. Это налагает на нас большую ответственность, потому что от грамотно и точно проведенной экспертизы лекарственного препарата нередко напрямую зависит качество оказания лекарственной помощи, а, значит, жизнь и здоровье наших граждан.

Другое важнейшее направление деятельности центра — это научное совершенствование методического обеспечения экспертизы качества, эффективности и безопасности лекарственных средств. В состав центра входит несколько экспертных институтов, работающих каждый по своему направлению, сформирован коллектив высококвалифицированных специалистов.

Несколько лет назад за нашим центром было закреплено научное и информационно-методическое обеспечение экспертизы и контроля качества биомедицинских клеточных продуктов в рамках их регистрации, определение их эффективности и безопасности. Сейчас это направление активно развивается.

Серьезное внимание мы также уделяем образовательной деятельности с целью повышения профессиональной компетентности как экспертов учреждения, так и субъектов сферы обращения лекарственных средств.

Какие нововведения в организации работы ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Вы инициатируете в первую очередь?

Думаю, следует говорить не столько о нововведениях, сколько о развитии уже существующей системы. Любая система, какой бы успешной она ни была, должна постоянно совершенствоваться. А тем более система, связанная с экспертизой лекарственных средств. Появление новой коронавирусной инфекции повлекло за собой ряд регуляторных мер в фармацевтической сфере. В Российской Федерации, как и во всех развитых странах Европы, начинает формироваться новая фармацевтическая стратегия, которая самым непосредственным образом отразится на деятельности нашего научного центра. Поэтому мы будем развивать и укреплять наше учреждение во всех направлениях. Национальная система экспертизы лекарственных средств должна быть современной.

Во-первых, будем более широко внедрять информационные технологии, или, как сейчас говорят, цифровой контур. Цифровая трансформация системы здравоохранения идет полным ходом, и нам никак нельзя отставать. Сейчас все завязано на информатизации: и организация работы экспертов, и создание регистрационных досье, и повышение квалификации — вообще все.

В настоящее время на интернет-портале научного центра реализованы электронные сервисы, которые направлены на облегчение работы в рамках различных процедур как заявителей, так и экспертов нашего центра и сотрудников Минздрава России. Заявители могут не только проверять валидность версий своих электронных досье, но и загружать версии с ответами на вопросы экспертов. Пользование этими сервисами значительно облегчает работу. Досье должно быть валидно и доступно в любой момент времени, то есть должно содержать актуальную информацию по каждому параметру досье — от сертификата анализа на вспомогательное вещество до обновления периодической информации по фармаконадзору.

Современные облачные технологии электронных досье — это шаг вперед, особенно учитывая то, что экспертные организации обязаны обеспечивать хранение, сохранность и предоставление регистрационных досье на лекарственный препарат с использованием информационных систем в течение не менее 20 лет, включая актуальные первоначальные и промежуточные редакции входящих в них документов. Поэтому мы должны создать такую коммуникационную среду, такие возможности для взаимодействия всех заинтересованных сторон, которые позволят нам работать более слаженно и эффективно.

Во-вторых, мы начали проводить мероприятия по трансформации Центра образовательных программ, так как профессиональный уровень как экспертов учреждения, так и специалистов фармкомпаний, которые формируют и подают регистрационные досье, должен быть более высоким.

Мы привлекли к этой работе фармассоциацию, создали рабочие группы из числа ведущих специалистов отрасли. Члены рабочих групп предложили массу тем, которые они хотели бы обсудить и чему хотели бы обучать специалистов. Люди радуются тому, что у них появилась возможность высказаться, передать коллегам свой опыт. Центру образовательных программ дали очень емкое название — Фармацевтическая орбита, так как обучение будет включать все вопросы, связанные с жизненным циклом лекарственных препаратов, начиная от разработки, производства, реализации, медицинского применения и заканчивая утилизацией, а также строгое соблюдение всех стандартов качества, таких как GLP (доклинические исследования), GCP (клинические испытания), GVP (фармаконадзор), GMP (производство), GSP (хранение), GDP и GPP (оптовая и розничная реализация).

В-третьих, мы будем планомерно укреплять международное сотрудничество и развивать связи с подобными нам структурами как в СНГ, так и в странах дальнего зарубежья, выводить наши научные достижения на более высокий, международный, уровень, гармонизировать российские требования к качеству, эффективности и безопасности лекарственных препаратов с международными. Причем речь идет не только об экспертизе качества средств медицинского применения, но и о гармонизации деятельности в целом в рамках Евразийской экономической комиссии, Европейского союза и других международных регуляторных практик.

Валентина Владимировна, Вы упомянули о гармонизации нашей деятельности с общемировой практикой. Как она будет осуществляться?

Наш научный центр уже представляет Россию в программе ВОЗ по безопасности лекарственных средств, участвует в работе Евразийского экономического союза по формированию единого рынка лекарственных средств. У нас есть яркий пример гармонизации фармакопеи с ЕАЭС, Российская Федерация гармонизирована с Европой по выпуску иммунобиологических лекарственных препаратов.

Вопросы формирования единого пространства в рамках Евразийского экономического союза определены соглашением о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств. Особое внимание уделяется вопросам регистрации и экспертизы качества лекарственных препаратов.

С января 2021 года регистрация новых лекарственных препаратов на территории Российской Федерации осуществляется в строгом соответствии с правилами ЕАЭС, и эта работа требует планомерного подхода.

Специалисты нашего экспертного учреждения входят в состав Фармакопейного комитета ЕАЭС, они принимают активное участие в подготовке проектов фармакопейных статей. Это очень важная и серьезная работа, и практически все статьи, которые

выносит на рассмотрение Фармакопейного комитета союза российская сторона, были подготовлены сотрудниками нашего центра. Уже началась работа по стандартным образцам, и она в самое ближайшее время получит свое дальнейшее развитие.

Наше тесное сотрудничество с Евразийской экономической комиссией позволяет гармонизировать российские требования к качеству лекарственных средств с международными требованиями. Мы намерены привлекать к обучению специалистов-экспертов из других стран ЕАЭС, чтобы гармонизировать подходы к экспертизе лекарственных препаратов перед их регистрацией и избежать противоречий.

В Вашей нынешней деятельности помогает опытный взгляд бывшего ключевого сотрудника Росздравнадзора?

Безусловно! Приобретенные в рамках предыдущей работы знания ключевых инструментов и механизмов, определяющих обращение лекарственных средств, практический опыт организации контроля качества лекарственных средств, участие в современных законодательных инициативах в этой сфере позволяют по-новому взглянуть на деятельность организации, наметить пути развития.

Валентина Владимировна, Вы пока единственная женщина в плеяде руководителей ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Каково это — возглавлять такую организацию?

Я не сторонник гендерного подхода в теории руководства. Считаю, что все зависит от деловых качеств и профессионализма самого человека. Принимать правильные решения, поступать взвешенно и объективно в любых рабочих условиях и жизненных обстоятельствах — вот что должно находиться в основе оценки деятельности любого руководителя.

У меня достаточно большой опыт работы в фармацевтической отрасли, в органах государственной власти. Мне довелось работать и в аптеке, и в лаборатории по контролю качества лекарственных средств, и на предприятии по производству лекарственных препаратов. Довелось принимать самое непосредственное участие в разработке системы государственного контроля качества лекарственных средств, в подготовке проектов федеральных законов, регулирующих эту сферу деятельности. Поэтому все направления работы Научного центра экспертизы средств медицинского применения, который я сейчас возглавляю, мне знакомы.

К счастью, у меня были очень хорошие учителя, которые в свое время многому меня научили и с которыми мы всегда были на одной волне.

К настоящему времени в научном центре сформировался хороший коллектив специалистов. Я вижу, что люди хотят работать, что они искренне заинтересованы в результатах своей деятельности. Уверена, что вместе нам удастся решить любые поставленные перед нами задачи. Наш научный центр должен стать организацией, по-настоящему мощной во всех отношениях.

Руководство такой мощной структурой требует, конечно же, немало сил. В чем (или в ком) Вы находите опору себе?

Прежде всего, в своих коллегах по работе. Во взаимопонимании и поддержке со стороны руководства Минздрава России, с которым нас связывает многолетнее сотрудничество. В поддержке специалистов нашего центра, профессионализм большинства которых не вызывает сомнений. И, конечно же, в своей семье, поддержку которой я ощущаю каждодневно.

Валентина Владимировна, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России является учредителем трех научных журналов: «БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение», «Безопасность и риск фармакотерапии» и «Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения», главным редактором которого Вы сейчас являетесь. Насколько эти журналы связаны с непосредственной деятельностью центра, и каким Вы видите их дальнейшее развитие?

Каждый из этих журналов имеет свою достаточно давнюю историю и самым непосредственным образом связан с деятельностью нашего научного центра. Ведущие сотрудники центра публикуют в них результаты своей научной деятельности. Вместе с тем эти журналы открыты «городу и миру» и постепенно входят в разряд ведущих научных изданий — каждый в своей предметной области.

В 2019 г. все три журнала включены в международную реферативную базу данных Chemical Abstracts Service — химическую реферативную службу, подразделение Американского химического общества, а журнал «БИОпрепараты...» в июне 2021 г. включен в базу данных Russian Science Citation Index (RSCI) на платформе Web of Science. Это, конечно, еще далеко не Scopus, но потенциал у этих журналов, на мой взгляд, достаточно высокий. Мы будем менять подходы к их внутренней структуре, наполнению и продвижению в профессиональном сообществе — как внутри страны, так и за рубежом.

Какие слова Вы могли бы начертать на флаге ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России?

Профессионализм. Ответственность. Качество.

Беседовала Ольга Федотова

Фотография В.В. Косенко предоставлена Ольгой Гойкаловой

Особенности и значимость оценки подгрупп в подтверждающих клинических исследованиях

О. И. Басова*, И. В. Лыскова, О. Ю. Иванова

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. Анализ подгрупп пациентов играет важную роль в интерпретации результатов подтверждающих клинических исследований и в большинстве случаев обязателен к выполнению. Целью анализа является оценка согласованности (гетерогенности) терапевтического эффекта в подгруппах пациентов, выделенных на основании демографических характеристик, стадии и степени тяжести основного заболевания, наличия определенной генетической мутации и др. Однако существующие методологические проблемы (проблема множественных сравнений, случайные различия между подгруппами и т.д.) затрудняют его проведение и часто приводят к спорным выводам. Цель работы — анализ и систематизация подходов зарубежных регуляторных органов к оценке подгрупп в подтверждающих клинических исследованиях, формирование научно обоснованных требований к ее выполнению и интерпретации результатов спонсорами клинических исследований и экспертами при проведении экспертизы отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения лекарственных препаратов с целью их регистрации по национальным правилам и по правилам Евразийского экономического союза. В работе рассмотрены цели проведения анализа подгрупп и статистические подходы к его выполнению, приведены примеры такого анализа из регуляторной практики. Описаны подходы к интерпретации анализа подгрупп в зависимости от наличия или отсутствия доказательства основной гипотезы исследования, характера обнаруженных гетерогенных эффектов исследуемого препарата в подгруппах и выбора самих подгрупп. Освещены проблемные аспекты анализа подгрупп, возможные противоречия интерпретации полученных результатов, регуляторные ожидания. Представленные рекомендации могут быть использованы экспертами при проведении экспертизы отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения лекарственного препарата, а также разработчиками лекарственных средств при подготовке протоколов и отчетов клинических исследований.

Ключевые слова: подгруппы; подтверждающий анализ подгрупп; поисковый анализ подгрупп; взаимодействие; гетерогенность; статистические методы; клинические исследования; регуляторные органы; эффективность и безопасность; стратификация

Для цитирования: Басова ОИ, Лыскова ИВ, Иванова ОЮ. Особенности и значимость оценки подгрупп в подтверждающих клинических исследованиях. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(2):81–93. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-81-93>

* **Контактное лицо:** Басова Ольга Игоревна; basovaoi@expmed.ru

Specific Aspects and Significance of Subgroup Assessment in Confirmatory Clinical Trials

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

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

Abstract. Patient subgroup analysis plays an important role in interpretation of confirmatory clinical trial results and is mandatory in most cases. The purpose of subgroup analysis is to assess the consistency (heterogeneity) of the treatment effect in subgroups of patients identified based on such characteristics as demographics, stage and severity of the underlying disease, presence of a certain genetic mutation, etc. However, existing methodological issues (the problem of multiple comparisons, detection of differences between subgroups by chance alone, etc.) make it difficult to carry out the analysis and often lead to controversial conclusions. The aim of the study was to analyse and summarise foreign regulatory approaches to subgroup analysis in confirmatory clinical trials, and to elaborate science-based requirements for subgroup analysis and interpretation of the results by clinical trial sponsors and experts when assessing the risk-benefit ratio of medicinal products for the purpose of their authorisation in Russia and the Eurasian Economic Union. This paper discusses the objectives of subgroup analysis and statistical approaches to its performance, provides relevant examples of such analysis from regulatory practice. It describes approaches to interpretation of subgroup analysis depending on the presence/absence of evidence supporting the primary hypothesis of the study, the nature of the experimental medicinal product's heterogeneous effects in the subgroups, and selection of the subgroups. The paper highlights areas of concern in subgroup analysis, potential controversies in interpretation of the obtained results, and regulatory expectations. The recommendations presented in the paper can be used by experts in the assessment of the risk-benefit ratio, as well as by medicine developers in the preparation of clinical trial protocols and reports.

Key words: subgroups; confirmatory subgroup analysis; exploratory subgroup analysis; interaction; heterogeneity; statistical methods; clinical trials; regulatory authorities; efficacy; safety; stratification

For citation: Basova OI, Lysikova IV, Ivanova OYu. Specific aspects and significance of subgroup assessment in confirmatory clinical trials. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(2):81–93. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-81-93>

* **Corresponding author:** Olga I. Basova; basovaoi@expmed.ru

Вопросами научной методологии анализа подгрупп в клинических исследованиях (КИ) и его применением в регуляторной практике занимаются научные коллективы по всему миру. В 2015 г. рабочая группа Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) подготовила технический документ по анализу подгрупп в подтверждающих исследованиях [1], в 2019 г. Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) выпустило руководство по методологии и интерпретации результатов анализа подгрупп¹, содержание которого практически полностью соответствует вышеупомянутому документу FDA. Еще один концептуальный документ, основные выводы которого в целом согласуются с позицией регуляторных органов, был подготовлен совместной рабочей группой Европейской федерации статистиков в фармацевтической промышленности (European Federation for Statisticians in the Pharmaceutical Industry, EFSPi) и профессиональной организацией статистиков в фармацевтической промышленности (Statisticians in the Pharmaceutical Industry, PSI) PSI/EFSPi [2], представляющей интересы фармацевтических компаний — разработчиков лекарственных средств.

Фактически между регуляторными органами и спонсорами КИ был достигнут консенсус по общим вопросам анализа подгрупп (например, необходимость предварительной спецификации ключевых подгрупп, понятие биологического правдоподобия и т.д.), хотя имеющиеся разночтения в деталях еще не урегулированы и на практике могут приводить к серьезным спорным ситуациям. В частности, одна из центральных идей документа ЕМА², касающаяся поискового анализа подгрупп при изучении отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения лекарственных препаратов (соотношение «польза — риск») в подтверждающих КИ, заключается в методологическом подходе «генерирования сигналов». Под «сигналом» подразумевается вероятность обнаружения подгруппы, в которой эффект лечения отличается по величине/знаку от значений, наблюдаемых в остальной популяции исследования, при этом номинальный уровень значимости теста взаимодействия p должен составлять $>0,05$. Предложенный методологический подход обусловлен необходимостью проверки согласованности терапевтического эффекта между разными подгруппами исследования для определения границ охвата целевой популяции и подтверждения заявленных разработчиком показаний к применению лекарственного препарата (ЛП). Согласно техническому документу FDA для обнаружения потенциально

важных статистических взаимодействий уровень значимости теста взаимодействия p может составлять 0,10 или даже 0,20, однако в этом документе подчеркивается некорректность утверждения о применимости данной рекомендации для каждого конкретного случая вне зависимости от контекста [1]. В подготовленном PSI/EFSPi документе высказаны опасения касательно принятия ошибочных регуляторных решений вследствие ложноположительно-го обнаружения взаимодействия при номинальном уровне значимости $p = 0,10$ и предложены альтернативные статистические подходы к выполнению анализа подгрупп [2]. На практике такие разночтения означают противоположные стратегии проведения анализа подгрупп и, следовательно, интерпретации результатов терапевтической эффективности ЛП в подгруппах пациентов.

Цель работы — анализ и систематизация подходов зарубежных регуляторных агентств к оценке подгрупп в подтверждающих клинических исследованиях; формирование научно обоснованных требований к ее выполнению и интерпретации спонсорами клинических исследований и экспертами при проведении экспертизы отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения лекарственных препаратов с целью их регистрации по национальным правилам и по правилам Евразийского экономического союза.

КЛЮЧЕВЫЕ ПОНЯТИЯ АНАЛИЗА ПОДГРУПП

Основные термины, используемые в области анализа подгрупп в КИ³, перечислены ниже.

Гетерогенность (heterogeneity) отражает степень различий пациентов в целевой популяции или в популяции КИ в отношении прогностических факторов клинического исхода/величины терапевтического эффекта. Изучение эффектов лечения в четко определенных подгруппах пациентов тем важнее, чем более неоднородной является исследуемая популяция.

Согласованность (consistency) эффектов лечения в представляющих интерес подгруппах отражает степень применимости оценки общего терапевтического эффекта ко всей исследуемой популяции. По каждому конкретному предполагаемому показанию к применению требуется оценить степень различий эффекта лечения между клинически значимыми подгруппами (то есть выявление потенциальной несогласованности). Выявленная несогласованность в оценках эффектов лечения между подгруппами является поводом для проведения дальнейшего анализа подгрупп.

Достоверность (credibility) отражает степень доверия к полученным выводам по итогам проведенного анализа подгрупп и, следовательно,

¹ Guideline on the investigation of subgroups in confirmatory clinical trials. EMA/CHMP/539146/2013. EMA; 2019.

² Там же.

³ Там же.

возможность их использования в принятии соответствующих регуляторных решений. Достоверность зависит от степени научной обоснованности, в том числе клинической, и биологических предпосылок к получению таких результатов, а также их воспроизводимости.

Биологическое правдоподобие (biological plausibility) отражает возможность прогнозирования терапевтического эффекта (то есть различных эффектов лечения между подгруппами) на основании клинических и/или фармакологических знаний. Под указанной концепцией подразумевается наличие определенных клинических и фармакологических суждений, не поддающихся какой-либо количественной оценке и являющихся аналитическими по своей природе. Любые имеющиеся предположения, подкрепленные фактами (как внешними, так и внутренними, основанными на результатах собственных доклинических/клинических исследований), должны быть рассмотрены еще на стадии планирования исследования.

Репликация (replication) — воспроизводимость полученных результатов проведенного анализа подгрупп в нескольких источниках данных (как внутренних, так и внешних). Под этим термином подразумевается одинаковое влияние определенной ковариаты на величину терапевтического эффекта или наличие различных эффектов в определенных подгруппах, наблюдаемое не только в одном подтверждающем КИ, но и в независимых КИ (другое КИ фазы III, поисковое КИ фазы II или КИ вне программы клинической разработки препарата, но со схожими экспериментальными условиями).

ЦЕЛИ АНАЛИЗА ПОДГРУПП В ПОДТВЕРЖДАЮЩИХ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Обобщенная оценка терапевтического эффекта по всей гетерогенной популяции исследования / совокупности исследований позволяет судить о терапевтическом охвате исследуемого препарата, то есть подразумевает проведение КИ в формате «pragmatic clinical trials» — максимально приближенных к реальной клинической практике и не ограниченных узко заданными критериями включения/невключения в исследование. Распространена практика выбора в качестве основной популяции для первичного анализа эффективности популяции по назначенному лечению (ITT популяции), подразумевающей наличие пациентов с разной комплаентностью и различными клиническими сценариями в исследовании.

Однако обобщенные по всей популяции исследования данные по первичному/вторичным критериям эффективности препарата не позволяют выявить потенциальные клинические фенотипы с разными ответами на лечение, в то время как сведения о терапевтических эффектах исследуемого

препарата у пациентов с различными клиническими характеристиками могут быть использованы для дальнейших исследований оценки эффективности и безопасности лечения и выработки клинических стратегий.

Таким образом, основными целями проведения анализа подгрупп являются:

1) оценка согласованности (при выявлении несогласованности — дальнейшая оценка степени гетерогенности) терапевтического эффекта между разными подгруппами исследования для определения показаний к применению (границ охвата целевой популяции);

2) поиск подгруппы, в которой применение препарата наиболее эффективно и/или безопасно (лучшее соотношение «польза — риск»);

3) поиск подгруппы с неблагоприятным соотношением «польза — риск».

ФАКТОРЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЦЕЛЕВЫХ ПОДГРУПП

Факторы идентификации подгрупп можно разделить на прерандомизационные (например, стратификация при рандомизации и/или исходные значения переменных на скрининге) и пострандомизационные (например, подгруппа пациентов с терапевтическими неудачами). Прерандомизационные факторы выбирают исходя из существующих предпосылок потенциальной прогностической значимости фактора в отношении результатов лечения; пострандомизационные факторы идентификации подгрупп, как правило, носят исключительно поисковый характер. Ниже перечислены факторы, лежащие в основе идентификации различных подгрупп *a priori*⁴:

1) существуют настолько веские основания ожидать неравномерного ответа на лечение при разных уровнях некоторого фактора, что общая оценка терапевтического эффекта исследуемого препарата будет невозможна в рамках одного КИ. В этом случае необходимо запланировать проведение независимых КИ;

2) фактор считается прогностическим в отношении клинического исхода, или, по крайней мере, существуют некоторые биологические предпосылки или сторонние доказательства существования неравномерного терапевтического эффекта. В дополнение к стратификационным факторам при рандомизации в данную категорию можно включить демографические факторы, в том числе регион проживания пациента, и факторы, связанные с механизмом действия и/или фармакологическими свойствами препарата. Следует рассмотреть другие факторы, которые могут учитываться при прогнозировании ответа на лечение: стадия, тяжесть или фенотип заболевания, наличие генетических мутаций, использование сопутствующей терапии. Для того чтобы сделать заключение об эффективности препарата

⁴ Там же.

во всей популяции исследования, не требуется формальное доказательство его эффективности для всех ключевых подгрупп, идентифицированных на основании вышеперечисленных факторов (за исключением факторов, указанных в п. 1);

3) для заключения о наличии эффектов препарата по всей популяции исследования не требуется формальное доказательство эффективности препарата в подгруппе, характеризующейся идентификационным фактором, для которого приведены убедительные аргументы (фармакологическое обоснование и клинические данные) отсутствия влияния на оцениваемые эффекты исследуемого препарата (или же если имеющиеся данные не позволяют оценить его возможное влияние на правдоподобность согласованности эффектов препарата).

СТАТИСТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АНАЛИЗА ПОДГРУПП В КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Традиционно статистические и методологические проблемы анализа подгрупп разделяют на объективные (инфляция ошибки I рода вследствие множественных сравнений, низкая мощность) и субъективные (отсутствие предварительной спецификации подгрупп и допущенные ошибки в статистическом анализе). Необходимость проведения анализа подгрупп не ставится под сомнение, речь идет о том, как максимально корректно его выполнять, не допуская методологических ошибок.

Статистические подходы к анализу подгрупп следует разделять в зависимости от цели его выполнения: анализ подгрупп как часть стратегии подтверждающего тестирования статистических гипотез в КИ фазы III и поисковый анализ подгрупп как часть оценки соотношения «польза — риск» в контексте согласованности эффекта лечения в популяции КИ. При проведении анализа подгрупп как части стратегии подтверждающего тестирования ключевые подгруппы должны быть определены заранее на этапе планирования КИ с использованием обязательной научной аргументации и стратификации по идентификационным факторам подгрупп при рандомизации. Наличие подгрупп должно учитываться на этапе оценки размера выборки КИ фазы III (например, указание о включении в КИ не менее 30% пациентов от общего запланированного числа участников для формирования ключевой подгруппы) с учетом необходимости введения поправки на множественное сравнение.

Количество ключевых подгрупп, подлежащих оценке, должно быть небольшим. Анализ по первичной конечной точке в такой подгруппе может быть указан в протоколе КИ как тестирование гипотезы, составляющей семейство первичных конечных точек с контролем ошибки I рода или как часть

иерархического тестирования и анализ ко-первичной конечной точки (т.е. без введения поправки на множественное сравнение). Подтверждающий анализ подгрупп целесообразен в случае равноценной клинической значимости субпопуляции пациентов и общей популяции, что в случае подтверждения эффективности исследуемого препарата в подгруппе позволит зарегистрировать его для применения в данной субпопуляции (в случае иерархического тестирования и ко-первичной конечной точки — при обязательном доказательстве эффективности в общей популяции; в случае конечной точки, составляющей семейство первичных конечных точек, достаточно доказательства эффективности только в ключевой подгруппе). Вопросы дизайна КИ и статистического анализа в случае наличия множественных сравнений описаны в проектах руководств FDA и EMA⁵.

Спланированный еще на этапе разработки проекта протокола подтверждающий анализ подгрупп особенно актуален в случае сложных адаптивных дизайнов с промежуточными анализами эффективности, таких как двухэтапные и бесшовные дизайны КИ фазы II/III. Для КИ указанных дизайнов, особенно распространенных в онкологии, подтверждение эффективности в подгруппе пациентов, определенной по экспрессии биомаркера / гистологическому типу опухоли / линиям предшествующей терапии, позволяет оптимизировать процесс клинической разработки препарата и ускорить процесс его регистрации для применения пациентами, которые могут получить наибольшую пользу от лечения. Обсуждение концепции и статистических аспектов мультипопуляционных КИ представлено в обзоре В.А. Millen и соавт. [3].

Таким образом, если ожидается значительное взаимодействие идентификационных факторов ключевых подгрупп и исследуемой терапии на этапе планирования КИ, то статистическая мощность исследования должна быть достаточной для выполнения подгруппа-специфических статистических тестов (то есть выявления терапевтического эффекта в ключевых подгруппах). При выявлении значительных различий терапевтического эффекта в подгруппах рекомендуется провести анализ методом контрастов по разности и знаку величины эффекта. Если эффекты в подгруппах различаются по знаку, следует провести сравнение средних значений эффектов в подгруппах методом наименьших квадратов.

В случае поискового анализа подгрупп как части оценки соотношения «польза — риск» в контексте согласованности эффекта лечения в отчете о проведенном КИ первоначально приводится описательная статистика результатов оценки эффективности по подгруппам, заранее указанным в протоколе КИ (но при этом не обязательно ограничивается только

⁵ Multiple endpoints in clinical trials. Guidance for Industry. Draft guidance. FDA; 2017.

Guideline on multiplicity issues in clinical trials. Draft. EMA/CHMP/44762/2017. EMA; 2016.

ими). Основным способом представления результатов является график типа «форест-плот», основным статистическим методом анализа — тесты взаимодействия.

Статистические взаимодействия зависят от используемой шкалы и статистической модели. Взаимодействие в моделях линейной регрессии представляет собой отклонение от аддитивности (различия в эффекте лечения по абсолютной шкале), в то время как взаимодействие в модели логистической регрессии и/или регрессии Кокса является отклонением от мультипликативной модели (различия в эффекте лечения по относительной шкале). Рекомендуется оценивать взаимодействие «подгруппа*терапия» (interaction tests) и сами эффекты лечения в подгруппе по изначально выбранной шкале оценки первичной конечной точки. Дополнительно может быть проведен анализ для ковариат или подгрупп с выявленной несогласованностью терапевтического эффекта по другой шкале оценки конечной точки (в том числе для изучения зависимости несогласованности от используемой шкалы).

Уровень статистической значимости теста взаимодействия p может быть $\geq 0,05$ при реализации подхода «генерирования сигналов» в контексте оценки согласованности эффекта лечения; при проведении анализа поправка на множественность не рекомендуется. Так или иначе, требуется дальнейший анализ данных при обнаружении «сигналов» или статистически значимого взаимодействия с позиции не только статистики, но и клинической интерпретации (принимая во внимание результаты по вторичным конечным точкам эффективности и профиль безопасности в исследуемых подгруппах).

Используемые для целей поискового анализа подгрупп статистические подходы имеют свои преимущества и недостатки. Так, например, тесты взаимодействия «подгруппа*терапия» приводят к ложноположительным и ложноотрицательным результатам вследствие низкой мощности теста, в том числе по причине различающихся по численности сравниваемых подгрупп. Вероятность того, что терапевтический эффект исследуемого препарата будет ниже, чем в группе сравнения, при его положительных статистически значимых результатах на общей популяции стремительно возрастает при увеличении числа подгрупп для анализа и уровней факторов идентификации подгрупп (в особенности при неравномерном распределении пациентов по уровням фактора и небольшом размере эффекта). Поэтому для реализации идеи «генерирования сигналов» предлагается проводить тестирование статистической гипотезы об отсутствии гетерогенности эффекта лечения в подгруппах при номинальном уровне значимости $>5\%$ (приоритет мощности над величиной ошибки I рода).

Для отображения эффекта лечения в подгруппах широко используются графики типа «форест-плот», по которым путем визуального сравнения можно выявить подгруппы с менее или, наоборот, более выраженным эффектом. Однако подобные графики строятся без учета корреляции между идентификационными факторами перекрывающихся подгрупп и без учета влияния конфаундинг-факторов.

Методы, основанные на байесовской интерпретации вероятности, могут применяться в поисковом анализе заранее определенных подгрупп как при изучении согласованности эффекта лечения в популяции КИ, так и для определения размера выборки планируемого КИ, целью которого является подтверждение наличия выраженного терапевтического эффекта, ранее обнаруженного в подгруппе пациентов при проведении поискового анализа в другом КИ. Как правило, байесовская оценка эффекта лечения в подгруппе более точна, чем выборочная оценка для той же подгруппы. Среди байесовских методов можно выделить методы оценки усадки (shrinkage estimation), применяемые в байесовском иерархическом моделировании [4, 5]. В качестве основного предположения в нем выступает вероятностная перестановочность априорного распределения подгруппа-специфических эффектов лечения, что, однако, не всегда является корректным допущением. При выборе указанных методов в целях поискового анализа подгрупп в подтверждающих КИ следует критически оценивать исходные допущения, проводить оценку адекватности созданной статистической модели. Методы оценки усадки не являются основанием для игнорирования результатов в подгруппах, в которых эффект лечения меньше его среднего значения в популяции КИ в целом. При обнаружении таких результатов следует проверять их на достоверность⁶. Кроме того, методы оценки усадки не подходят для анализа данных по безопасности в подгруппах пациентов.

Таким образом, ключевыми задачами при интерпретации анализа подгрупп являются:

- обнаружение статистической значимости различий терапевтического эффекта между подгруппами — значимые тесты на взаимодействие;
- оценка распределения ковариат в исследуемых подгруппах;
- оценка возможного влияния сопутствующих факторов, способных повлиять на конечные результаты КИ (конфаундинг-факторы);
- итоговая оценка величины эффекта (правдоподобный эффект / возможный эффект / отсутствие терапевтического эффекта).

В таблице 1 в качестве примера представлены некоторые статистические методы, используемые при анализе подгрупп в подтверждающих КИ (подтверждающий и поисковый анализы подгрупп).

⁶ Guideline on the investigation of subgroups in confirmatory clinical trials. EMA/CHMP/539146/2013. EMA; 2019.

Таблица 1. Статистические методы, используемые при анализе подгрупп

Table 1. Statistical methods used in subgroup analysis

Типы методов Types of methods	Реализация Implementation
Проверка распределения ковариат/корректировка Covariate distribution/ covariate adjustment	Сводная исходная статистика по основным ковариатам. Сравнение средних значений или медиан непрерывных ковариат и распределение категориальных ковариат между пациентами (например, стандартизированное различие). Поправка на прогностические ковариаты может привести к увеличению мощности, поправка на остальные ковариаты может привести к увеличению стандартной ошибки среднего (SE) и, следовательно, снижению мощности. Корректировка может привести к инфляции ошибки I рода также в случае небольшой выборки и бинарной первичной переменной или времени-до-события [6]. Некоторые подходы к выбору ковариат в регрессионных моделях: прямой отбор, обратное исключение, пошаговая регрессия, критерии отбора моделей на основании информационных критериев (информационный критерий Акаике (AIC), байесовский информационный критерий (BIC), скорректированный коэффициент детерминации, Ср-критерий Мэллоу) и др. Для обобщенных линейных моделей или нелинейных моделей скорректированные на ковариату оценки эффекта лечения следует сравнивать с нескорректированными оценками. Для сравнения распределений непрерывных исходных ковариат между подгруппами можно использовать графические методы: диаграммы размаха, квантиль-квантиль графики рассеяния, кумулятивные функции распределения, непараметрические эмпирические функции распределения Baseline summaries with respect to main covariates. Comparison of the means or medians of continuous covariates and the distribution of their categorical counterparts between subjects (for example, standardised difference). Adjustment for prognostic covariates can lead to increased power, adjustment for nonprognostic covariates can lead to increased standard error, and thus a decrease in power. Covariate adjustment can lead to inflated type I error rates when there is a small sample size and a binary or time-to-event outcome [6]. Some examples of covariate selection methods in regression models include but are not limited to: forward selection, backward elimination, stepwise regression, criterion-based procedures (Akaike Information Criterion, Bayesian Information Criterion, adjusted R², Mallow's Cp Statistic), and others methods. For generalised linear models or non-linear models, adjusted estimates of the treatment effect should be compared to unadjusted estimates. Graphical methods: side-by-side boxplots, Q-Q plots, cumulative distribution functions, empirical nonparametric density plots can be used to compare the distribution of continuous baseline covariates between subgroups
Тесты взаимодействия Statistical tests for interaction	Включение взаимодействия между факторами в типичные методы анализа (ANOVA, ANCOVA, регрессионный анализ для непрерывных данных и модели продольного анализа для динамических данных). В большинстве случаев взаимодействие «терапия*подгруппа» можно представить с одной степенью свободы с указанием PE и CI. Для такого взаимодействия однофакторная ANOVA с 4 группами (например, два вида терапии по двум регионам или двум уровням фактора стратификации) позволит оценить PE и оценку общей дисперсии (и затем методом контрастов оценить PE и CI для взаимодействия) [7]. Графические методы: график взаимодействия (отображает аппроксимированные значения зависимой переменной по оси Y, по оси X отображаются значения независимой переменной) Inclusion of interaction terms in the typical methods of analysis (ANOVA, ANCOVA, regression for continuous data and longitudinal analytical models for data collected over time). In most cases, the treatment-by-subgroup interaction can be reduced to a 1-degree of freedom setting with PE and CI. For such interaction, 1-way ANOVA with 4 groups (e.g., 2 treatments by 2 regions, or 2 levels of the stratification factor) provides both PEs and a common variance estimate. Then, using the contrast statement, the PE and CIs for this interaction can be constructed [7]. Graphical methods: interaction plot (displays the fitted values of the dependent variable on the y-axis, while the x-axis shows the values of the first independent variable)
Поправки на множественное сравнение Multiplicity adjustment methods	Спектр возможных вариантов колеблется от базовых непараметрических множественных проверок гипотез (например, поправки на основе процедуры Бонферрони) до более сложных модельных процедур, например параметрических (включая параметрические цепные процедуры и процедуры обратной связи) [8] Available options range from basic nonparametric multiple testing procedures (for example, Bonferroni-based procedures), to more sophisticated model-based multiple testing procedures, for example, parametric procedures (including parametric chain procedures and feedback procedures) [8]
Отображение эффекта лечения в подгруппах Visualisation of treatment effect in subgroups	Описательная статистика (PE, SE). Графические методы: график типа «форест-плот», график Гэлбрейта Descriptive statistics (PE, SE). Graphical methods: forest plot, Galbraith plot

Примечание. SE — стандартная ошибка, PE — точечная оценка, CI — доверительные интервалы, ANOVA — дисперсионный анализ, ANCOVA — ковариационный анализ.

Note. SE—standard error, PE—point estimate, CI—confidence interval, ANOVA—analysis of variance, ANCOVA—analysis of covariance.

В руководстве ЕМА⁷ подчеркивается, что заключение о наблюдаемой неоднородности эффекта лечения и принятие дальнейших регуляторных решений не могут базироваться исключительно на статистических выводах (в частности, репортирование отдельного *p*-значения из теста взаимодействия не может использоваться в качестве единственного аргумента при принятии таких решений) и требует обязательной верификации с использованием релевантной научно-медицинской информации. В большинстве случаев результаты анализа подгрупп *post hoc* могут быть использованы только для построения гипотез будущих исследований (в особенности если речь идет о КИ, в которых основная статистическая гипотеза не была доказана).

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОВЕДЕННОГО АНАЛИЗА ПОДГРУПП С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ РЕГУЛЯТОРНОГО ОРГАНА

Оценка результатов проведенного анализа подгрупп подтверждающего КИ при проведении экспертизы клинических данных регистрационного досье может быть различной в зависимости от статистической и клинической значимости полученных результатов.

Вариант 1: достигнута статистическая значимость результатов и продемонстрирована терапевтическая эффективность в первичной популяции для анализа⁸. Изучение согласованности эффектов лечения в различных субпопуляциях должно включать анализ подгрупп в соответствии с методами, описанными выше. Если анализ ключевых подгрупп был должным образом запланирован, в ходе КИ не были допущены отклонения, ставящие под сомнение научную правдоподобность анализа, и отсутствуют доказательства противоречивости результатов, то анализ подгрупп можно считать завершенным.

Несо согласованные или экстремальные значения по целевым переменным в поисковых подгруппах, где эксперт может подтвердить отсутствие правдоподобной связи ответа и терапии, обычно могут быть проигнорированы при условии, что такие результаты не повторяются более чем в одном исследовании. Если же экстремальные результаты воспроизводятся более чем в одном исследовании, для таких ситуаций оценка правдоподобия должна быть пересмотрена.

В случае если обсуждение полученных результатов и предварительная спецификация ключевых подгрупп были неполными, эксперт будет вынужден больше полагаться на приведенные данные, опираясь на *ad hoc* подход и собственное суждение о правдоподобности.

Несо согласованность терапевтических эффектов в подгруппе и в общей популяции исследования

может считаться вероятной и, следовательно, подлежать дальнейшей оценке спонсором исследований и регуляторными органами в случае наличия:

а) биологических предпосылок неравномерности эффекта в ожидаемом направлении (такая вероятность особенно велика, если доказательства встречаются в нескольких различных источниках, например в научной литературе или данных других проведенных КИ). В случае наличия в материалах регистрационного досье результатов только одного КИ, в котором должным образом оценена конкретная подгруппа и обнаружен несогласованный терапевтический эффект, последний не может быть проигнорирован только по причине отсутствия репликации в рамках КИ фазы III;

б) фактов обнаружения неравномерного эффекта в нескольких различных источниках данных (такая вероятность особенно велика, если есть и биологическая правдоподобность наблюдаемого неравномерного эффекта).

Правдоподобность неравномерности эффекта между подгруппами дополнительно подтверждается, если тесты взаимодействия являются статистически значимыми или погранично значимыми, а также если существуют некоторые свидетельства взаимодействий типа «терапия*ковариата» для различных конечных точек, охватывающих различные аспекты эффективности лечения и не связанных напрямую.

Вариант 2: продемонстрирована статистическая значимость результатов в первичной популяции анализа, но терапевтическая эффективность или соотношение «польза — риск» неубедительны⁹. Формальное доказательство эффективности (статистическая значимость) имеет первостепенное значение для разработки новых лекарственных средств. Тем не менее, даже если результаты анализа статистически достоверны, клиническая значимость эффекта лечения во всей популяции исследования или в отдельной субпопуляции может быть неубедительной. Для доказательства терапевтической эффективности также необходимо подтвердить благоприятное соотношение «польза — риск». Даже в случаях, когда фактические данные об эффективности убедительны со статистической точки зрения, целесообразно идентифицировать подгруппу, которая не была предварительно указана в качестве части стратегии подтверждающего тестирования, но для которой эффективность препарата и соотношение «польза — риск» были бы убедительны. Основные сценарии, при которых это может произойти:

1) польза фармакотерапии по всей популяции исследования является статистически значимой, но неубедительной с клинической точки зрения;

⁷ Там же.

⁸ Там же.

⁹ Там же.

2) польза фармакотерапии в популяции всех рандомизированных пациентов является статистически и клинически значимой, но существуют риски и неопределенности, которые не позволяют сделать вывод, что ожидаемая польза превышает возможный риск во всей популяции исследования;

3) польза фармакотерапии в популяции всех рандомизированных пациентов является статистически и клинически значимой, но существуют риски и неопределенности для отдельной субпопуляции исследования, которые не позволяют сделать вывод, что ожидаемая польза для нее превышает возможный риск.

При таких сценариях возникает не только проблема множественных сравнений, но и проблема предвзятости выбора подгруппы для оценки, поскольку идентификация интересующей подгруппы происходит уже после того, как станут известны результаты КИ. Таким образом, эксперт и заявитель будут обращать внимание на наиболее экстремальные результаты, в связи с чем оцениваемый эффект лечения и связанные с ним доказательства не обязательно окажутся достоверными. Для того чтобы исследуемая подгруппа считалась правомерной для оценки, обычно необходимо соблюдение всех ниже приведенных критериев. Указанные критерии применяются независимо от того, кто инициировал дополнительные исследования, — спонсор или регуляторный орган:

1) существуют внешние источники доказательств того, что исследуемая подгруппа является четко определенной и клинически значимой субпопуляцией пациентов. Обычно предполагается, что соответствующая подгруппа была определена на этапе планирования КИ (например, в результате стратифицированной рандомизации или выделения ее среди ключевых подгрупп) и приведена аргументация ее клинической релевантности;

2) существует фармакологическое обоснование причин различной эффективности (или соотношения «польза — риск») исследуемого препарата в субпопуляции и общей популяции пациентов (во внимание принимают также масштаб выявленных отличий и используемую шкалу оценки);

3) эффект лечения, наблюдаемый в подгруппе, обычно больше, чем во всей рандомизированной популяции исследования. Совокупность статистических доказательств, основанных на отдельных КИ и объединенных анализах, должна соответствовать тем же стандартам доказательств, которые обычно предъявляются для всей рандомизированной популяции, что указывает на выраженность эффекта в подгруппе по сравнению с имеющейся фоновой вариабельностью явления;

4) результаты анализа подгруппы воспроизводятся в других КИ (как проведенных спонсором, так и внешних КИ). Особые затруднения возникают

при рассмотрении заявки на регистрацию препарата, доказательства эффективности и безопасности применения которого основаны на результатах одного ключевого КИ, поскольку основным признаком достоверности выводов является идентичность результатов, полученных в различных КИ. В случае проведения только одного КИ биологические предпосылки и полученные клинические данные для исследуемой подгруппы должны быть исключительно убедительными;

5) в случае, когда рекомендации по лечению основаны на анализе подгруппы, необходимо провести тщательный анализ соотношения «польза — риск» в данной подгруппе, а также удостовериться в применимости данных по безопасности, полученных для популяции всех рандомизированных пациентов. Редкие серьезные нежелательные явления могут случайным образом не встречаться в интересующей подгруппе в рамках проведенного КИ, но должны быть учтены при оценке соотношения «польза — риск», если не обосновано иное.

Необходима тщательная проверка исходных клинических характеристик пациентов из исследуемой подгруппы для сравнения терапевтического эффекта в подгруппе между группами лечения. Может потребоваться корректировка различий по исходным клиническим характеристикам, чтобы гарантировать, что наблюдаемый в подгруппе пациентов терапевтический эффект исследуемого препарата не вызван или не усиливается из-за дисбаланса между группами лечения.

При соблюдении всех вышеперечисленных требований регистрация исследуемого препарата может быть ограничена показаниями к применению пациентами только из подгруппы КИ с выраженным терапевтическим эффектом; если же существенные различия между величиной эффекта лечения или соотношением «польза — риск» во всем КИ по-прежнему не будут объяснены, то регистрация препарата может оказаться невозможной.

Пример (гетерогенность эффекта лечения между подгруппами). В международном КИ фазы III PLATO, проведенном с участием более чем 18 000 пациентов с острым коронарным синдромом, было продемонстрировано преимущество тикагрелора перед клопидогрелом в общей популяции в отношении первичной комбинированной конечной точки «смерть от сосудистых причин / инфаркт миокарда / инсульт» (отношение риска (HR) 0,84) [9]. Однако по результатам предусмотренного протоколом КИ анализа подгрупп была выявлена гетерогенность результатов по эффективности для когорты пациентов из региона Северная Америка, составляющей ~10% от общей популяции КИ (HR 1,25), при этом для пациентов из других географических регионов были получены согласованные результаты (HR 0,80–0,86). Несмотря на то что анализ подгрупп в этом КИ носил

исключительно описательный характер (для идентификации подгрупп кроме географического было заранее выбрано более тридцати иных факторов и статистических поправок в связи с этим введено не было) и статистическая значимость теста взаимодействия «терапия*географический регион» составила немногим менее 5% ($p = 0,045$) — FDA первоначально не одобрило применение тикагрелора. Позднее независимыми статистическими группами был проведен дополнительный анализ данных для количественной оценки того, какая часть взаимодействия «терапия*регион» может быть объяснена клиническими характеристиками пациентов и сопутствующим лечением, включая поддерживающую терапию аспирином. В США больше пациентов (53,6%), чем в остальных странах (1,7%), принимали аспирин в средней дозе ≥ 300 мг/сут. Методом скорректированного по средней поддерживающей дозе аспирина регрессионного анализа Кокса и регрессионного анализа в восьми ориентирных временных точках (landmark analyses) было показано, что у пациентов, принимающих аспирин в низких дозах (≤ 100 мг/сут), тикагрелор ассоциировался с лучшими результатами по сравнению с клопидогрелом (HR 0,77). Однако по результатам статистического моделирования на основании частоты клинических исходов в разных странах и распределения пациентов было показано, что наблюдаемая структура результатов могла возникнуть случайным образом. Учитывая также отсутствие четкого биологического обоснования того, почему тикагрелор может быть менее эффективным, чем клопидогрел в сочетании с высокой поддерживающей дозой аспирина, был сделан вывод, что наблюдаемая неоднородность эффекта лечения могла быть случайной из-за большого количества нескорректированных анализов подгрупп, и препарат в итоге получил одобрение регуляторных органов США — с указанием, что суточная поддерживающая доза аспирина должна составлять 75–100 мг.

Вариант 3: статистическая значимость результатов в первичной популяции анализа не была достигнута, но существует заинтересованность в определении подгруппы, в которой можно оценить соответствующий эффект лечения и найти убедительные доказательства благоприятного соотношения «польза — риск»¹⁰. Подобная ситуация возникает в случае, если основная цель КИ не была достигнута, исследование потерпело неудачу (невозможность отклонить нулевую гипотезу, что обычно классифицируется как двусторонний $p > 0,05$). С формальной статистической точки зрения дальнейшее подтверждающее тестирование по дополнительным задачам КИ недопустимо, так как первичная статистическая гипотеза не была доказана.

Как правило, в таких ситуациях требуется проведение дополнительных КИ. В редких случаях

возможно одобрение препарата регуляторными органами без проведения дополнительных исследований. Основанием такого одобрения может быть невозможность повторного проведения КИ в больших популяциях (например, КИ препаратов для лечения сердечно-сосудистых заболеваний). В этом случае даже субпопуляции рандомизированных пациентов могут представлять значительное количество надежных доказательств для оценки эффективности лечения и соотношения «польза — риск».

Необходима тщательная оценка всех имеющихся доказательств, и спонсорам следует иметь в виду, что вышеописанный сценарий в большинстве случаев будет рассматриваться как не отвечающий предъявляемым требованиям для регистрации препарата. Если, тем не менее, в исключительных случаях рассматривается возможность вынесения положительного решения о регистрации, то должно быть представлено четкое обоснование того, почему должным образом спланированное КИ потерпело неудачу, несмотря на то что препарат считается эффективным, и почему проведение дополнительных проспективных КИ для установления формального доказательства эффективности неосуществимо или неоправданно.

Пример (препарат, не отвечающий предъявляемым требованиям). Исследования применения препарата адуканумаб по показанию «болезнь Альцгеймера» потерпели неудачу по результатам промежуточного анализа бесполезности в двух идентичных по дизайну КИ III фазы ENGAGE и EMERGE — соответствии критериям бесполезности $< 20\%$ условной мощности. Однако по окончании этих КИ компания Biogen подала заявку в FDA на получение маркетингового одобрения препарата на основании *post hoc* анализа — были повторно проанализированы данные КИ с дополнительным включением пациентов (12 и 18% от запланированного количества соответственно), продолживших участие в исследовании после даты проведения анализа бесполезности. В результате в КИ ENGAGE статистическая значимость по первичной переменной эффективности CDR-SB в отношении превосходства над плацебо не была достигнута в группе пациентов, получавших препарат в высокой дозе (6% ухудшение по сравнению с плацебо, $p = 0,627$), но в КИ EMERGE продемонстрировано улучшение на 23% по сравнению с плацебо ($p = 0,031$). Также было проведено сравнение с группами плацебо (численностью пациентов $n = 545$ и 548 соответственно) подгруппы пациентов ($n = 116$ и 147 соответственно), получавших адуканумаб в высокой дозе 10 мг/кг в течение 78 нед. исследования и не имеющих значительных отклонений от протокола [10]. Данный случай вызвал резкую критику как среди представителей фармацевтической индустрии, так и академического сообщества [11]. Причины, по которым проведенный

¹⁰ Там же.

компанией анализ неправомерен: 1) анализ подгруппы, меньшей, чем планировалось численности (40% пациентов не завершили КИ EMERGE); 2) необоснованность сравнения выборки пациентов с высокой комплаентностью с более гетерогенной группой плацебо; 3) указанная подгруппа составляет только 20% от численности пациентов, получавших препарат в высокой дозе, и предположительно включает большинство пациентов с отсутствием аллели APOE ε4 (прогностический биомаркер более тяжелого течения заболевания); 4) отсутствие репликации (внутренней — КИ ENGAGE, внешней — КИ препаратов подобного класса неоднократно терпели неудачу); 5) слабая биологическая правдоподобность (этиология заболевания неизвестна, его патогенетические механизмы в динамике в рамках амилоидной гипотезы изучены недостаточно).

Пример (проведение дополнительного КИ). В КИ SYNTAX не удалось доказать основную гипотезу наименьшей эффективности чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) по сравнению с аортокоронарным шунтированием (АКШ) у пациентов с ишемической болезнью сердца с трехсосудистым поражением коронарных артерий или стенозом ствола левой коронарной артерии — частота серьезных нежелательных сердечно-сосудистых или цереброваскулярных явлений в группе АКШ 12,4% vs. в группе ЧКВ 17,8%, $p = 0,002$, абсолютная разность 5,4%, верхняя граница одностороннего 95% ДИ 8,3% при границе не меньшей эффективности δ 6,6% (наличие подгрупп пациентов по локализации поражения было учтено при оценке мощности и размера выборки на этапе протокола КИ) [12]. Но проведенный *post-hoc* анализ подгрупп выявил, что для пациентов с поражением левой главной коронарной артерии (кроме пациентов с высокой анатомической сложностью по шкале SYNTAX Score) ЧКВ может являться приемлемой альтернативой АКШ [13]. В результате было проведено отдельное КИ EXCEL на указанной популяции пациентов с низкой и средней анатомической сложностью, в котором была продемонстрирована не меньшая эффективность ЧКВ АКШ в отношении комбинированной конечной точки «смерть / инфаркт миокарда / инсульт» в течение трех лет с момента проведения вмешательства (ЧКВ 15,4% vs. АКШ 14,7%, абсолютная разность 0,7%, верхняя граница одностороннего 97,5% ДИ 4,0%, $p = 0,02$ при δ 4,2%) [14]. Однако в 2019 г. возникли серьезные разногласия в кардиологическом сообществе относительно интерпретации результатов данного исследования [15, 16].

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО АНАЛИЗУ ПОДГРУПП НА СТАДИИ ПЛАНИРОВАНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полностью описать запланированный анализ подгрупп на этапе проекта протокола возможно

только в редких случаях. Несмотря на ограниченное количество информации об эффективности исследуемого препарата на этапе планирования подтверждающего КИ фазы III следует использовать всю доступную информацию для выбора оптимальной стратегии анализа данных. Поскольку наибольшее доверие вызывают результаты заранее запланированного в проекте протокола анализа подгрупп, следует уделить значительное внимание выбору подгрупп пациентов, представляющих интерес с клинической точки зрения, проводя анализ научной литературы по исследуемой нозологии. Кроме этого, еще на этапе КИ фазы II можно проводить поисковый анализ клинически значимых подгрупп¹¹.

Учет гетерогенности в целевой популяции.

Во время разработки дизайна и планирования статистического анализа КИ обсуждение известных прогностических (разграничивающих группы по разным клиническим исходам) и предиктивных (разграничивающих группы с различным ответом на лечение) факторов является одним из наиболее важных этапов подготовки исследования. На данном этапе необходимо выбрать целевую группу пациентов для КИ. В частности, следует определить, должны ли критерии включения/невключения ограничивать популяцию пациентов, например, одним уровнем определенного фактора, или же предполагается, что исследуемый препарат предназначен для всей популяции при условии, что пациенты во всех субпопуляциях, определяемых различными уровнями фактора, получают в значительной степени пользу от лечения.

КИ с включением широкого круга пациентов дает возможность регистрации препарата с расширенными показаниями к применению, но это также потребует от спонсора изучения согласованности ответа на лечение. Для дальнейшего принятия регуляторных решений по возможности рекомендуется представлять результаты одного или нескольких крупных КИ, охватывающих всю целевую популяцию пациентов для возможной оценки влияния различных факторов, модифицирующих терапевтический эффект, с целью последующего анализа отношения ожидаемой пользы к возможному риску и общей оценки прогнозируемой терапевтической эффективности исследуемого препарата. В проекте протокола КИ должна обсуждаться ожидаемая степень гетерогенности популяции пациентов с точки зрения как прогностических, так и предиктивных факторов. Ограничение популяции исследования субпопуляцией целевой популяции пациентов (то есть всеми пациентами в соответствии с предполагаемыми показаниями к применению) должно быть обосновано с учетом того, установлено ли такое ограничение из-за проблем безопасности, ожидаемой

¹¹ Там же.

недостаточной эффективности или каких-либо других соображений. Целесообразно собрать доказательства того, что исследуемый препарат не приносит пользы всем пациентам из популяции КИ (например, в случае использования предиктивных биомаркеров)¹².

Очевидно, что по мере проведения подтверждающих КИ объем данных будет увеличиваться и, следовательно, не все потенциальные источники гетерогенности могут быть предсказаны заранее. Сведения, полученные в ходе исследования, должны быть приведены на этапе анализа независимо от того, были ли они отражены в протоколе КИ или нет. Заслепленный промежуточный анализ данных (в случае его наличия в КИ) дает возможность изучить имеющиеся клинические данные и затем пересмотреть запланированный анализ подгрупп, избегая при этом предвзятости в оценке.

Стратегия выбора и определения подгрупп для оценки¹³. После тщательного выбора исследуемой популяции в КИ и исключения подгрупп пациентов, о которых имеются веские основания полагать, что терапевтический эффект лечения будет несогласованным, стратегия последующего анализа данных по окончании КИ, тем не менее, должна предусматривать доказательство правомерности предположения о согласованности эффекта. Без обсуждения и проведения дальнейших анализов предположение о согласованности эффекта лечения по всей популяции КИ, основывающееся на высокой вероятности ответа пациентов на лечение, является необоснованным.

Включенная в КИ популяция должна отражать эпидемиологию заболевания в целевой популяции пациентов (внешняя валидация). Следует рассмотреть необходимость стратификации при рандомизации (в сочетании с блоковой рандомизацией) для того, чтобы, во-первых, снизить риск несбалансированного распределения пациентов с различными уровнями факторов в группы терапии; во-вторых, выделить некоторые факторы подгрупп для анализа того, будут ли пациенты с различным профилем риска иметь одинаковую пользу от применения исследуемого препарата. В частности, необходимо изучить, являются ли известные прогностические стратификационные факторы также прогностическими для оценки эффективности и/или соотношения «польза — риск». Стратифицированная рандомизация допускает включение только ограниченного количества прогностических факторов в модель (корректировка по исходным значениям ковариат), поэтому на этапе планирования следует обсудить с врачами-исследователями потенциально важные прогностические и предиктивные факторы для исследования.

В проекте протокола должны быть отдельно выделены ключевые подгруппы (соответствующие определению фактора идентификации подгрупп 2 (нумерацию подгрупп см. выше)), а также перечислены поисковые подгруппы (соответствующие определению фактора идентификации подгрупп 3).

Четкое понимание приоритизации анализа различных подгрупп на этапе планирования КИ помогает минимизировать апостериорные суждения и способствует созданию достаточной доказательной базы для оценки клинически значимых подгрупп и снижению риска ошибочных заключений об эффективности или ее отсутствии в субпопуляциях пациентов. Важно достичь консенсуса между спонсором и регулятором по вопросам проведения анализа подгрупп еще на этапе планирования КИ. В противном случае, если в проекте протокола (и затем в подготовленном отчете о проведенном КИ) указанные вопросы были освещены в недостаточной мере, регуляторная оценка анализа подгрупп будет проводиться преимущественно в формате *post-hoc*.

В целом план первоначального анализа должен учитывать тип фактора (например, бинарный/категориальный/непрерывный) в отношении того, насколько он является прогностическим или предиктивным. Функциональная форма связи фактора с эффектом лечения (например, линейная зависимость) непрерывной переменной-ковариаты легко интерпретируется и делает возможной надлежащую классификацию подгрупп.

Если эффект лечения варьируется в зависимости от уровня конкретного фактора, последующие анализы могут включать категоризацию (для непрерывного фактора) или сжатые категории (для порядковой категориальной переменной с большим числом уровней), поскольку эти категории относятся к критериям, которые могут в конечном итоге использоваться при составлении инструкции или принятии клинических решений. Различные подходы к выполнению анализа подгрупп должны быть тщательно описаны в проекте протокола.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ СВЕДЕНИЙ ПО АНАЛИЗУ ПОДГРУПП В РЕГИСТРАЦИОННОМ ДОСЬЕ

При регистрации исследуемого препарата по правилам Евразийского экономического союза в экспертном отчете по оценке безопасности, эффективности и качества (далее — экспертный отчет по оценке) должны представляться результаты проведенного заявителем анализа подгрупп, включая представленное заявителем обсуждение результатов в контексте наличия гетерогенности в целевой популяции и потенциальных источников несогласованности терапевтического эффекта между субпопуляциями пациентов. Результаты анализа,

¹² Там же.

¹³ Там же.

демонстрирующие согласованность терапевтического эффекта, также должны представляться в экспертном отчете по оценке безопасности, эффективности и качества (экспертный отчет по оценке)¹⁴.

Помимо этого, в экспертном отчете по оценке приводятся выводы регуляторного органа относительно методологического качества проведенного анализа подгрупп, его научной обоснованности и клинической интерпретируемости полученных результатов¹⁵. В случае признания достоверности выявленной несогласованности терапевтического эффекта в экспертном отчете по оценке приводится соответствующее обсуждение с точки зрения клинической значимости, соотношения «польза — риск» и представления указанной информации в разделе «Общая характеристика лекарственного препарата» (ОХЛП)¹⁶. Если результаты, указывающие на несогласованность терапевтического эффекта, признаются недостоверными, то это также должно быть указано в экспертном отчете по оценке.

Представление сведений относительно согласованности терапевтического эффекта в разделе 5.1 «Фармакодинамические свойства» ОХЛП, как правило, не требуется, но может быть целесообразным при наличии важной информации для врача¹⁷. Если в ключевой подгруппе пациентов были получены неопределенные результаты по первичным переменным эффективности/безопасности, несмотря на положительные результаты в исследовании в целом, то такие сведения могут быть указаны в качестве предупреждения в разделе 4.4 «Особые указания и меры предосторожности при применении» ОХЛП вместе с данными, представленными в разделе 5.1. Результаты анализа подгрупп, указывающие на отсутствие терапевтической эффективности или неблагоприятное соотношение «польза — риск» в определенных подгруппах (в случае признания их достоверности), должны быть отражены в разделе 4.1 «Показания к применению» и/или 4.3 «Противопоказания» ОХЛП¹⁸.

Описание в экспертном отчете по оценке результатов КИ с выполненным анализом подгрупп,

соответствующим вариантам 2 или 3 сценариев оценки экспертом (о сценариях см. выше), должно содержать обстоятельное обсуждение с обоснованием принятого положительного решения о регистрации препарата по результатам такого анализа. Если целевая популяция ограничена подгруппой пациентов из популяции проведенного КИ, то результаты исследования эффективности и безопасности препарата сначала должны быть представлены в общем по всей популяции КИ, а затем отдельно по данной подгруппе в разделе 5.1. «Фармакодинамические свойства» ОХЛП. Объяснение того, почему результаты по эффективности и безопасности в данной подгруппе можно считать достоверными, могут быть представлены там же в краткой форме. Если аналогичные результаты по эффективности и безопасности для данной подгруппы повторяются сразу в двух проведенных КИ, то целесообразно представить результаты обоих КИ для описания степени согласованности результатов анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанные в работе требования отражают общие принципы планирования и проведения анализа подгрупп в подтверждающих КИ, обозначенные в международных руководствах и специализированной статистической литературе. Разработка указанных требований продиктована востребованностью анализа подгрупп и его зачастую ошибочным выполнением и некорректной интерпретацией результатов.

Представленные рекомендации целесообразно использовать как экспертам, осуществляющим экспертизу отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения ЛП, так и фармацевтическим компаниям при подготовке протоколов и отчетов клинических исследований ЛП.

Вклад авторов. *О. И. Басова* — разработка концепции, сбор и анализ данных, написание текста; *И. В. Лыскова* — обоснование актуальности работы, литературный обзор и написание текста; *О. Ю. Иванова* — научное редактирование, написание текста.

¹⁴ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Приложение № 16. Форма Экспертного отчета об оценке безопасности, эффективности и качества (IV. Оценка соотношения пользы и риска).

¹⁵ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Приложение № 15. Указания по составлению экспертного отчета об оценке клинических исследований (3. Клиническая эффективность, 3.4. Основные исследования, 3.4.1.8. Статистические методы и 3.4.2.7. Дополнительные анализы).

¹⁶ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Приложение № 15. Указания по составлению экспертного отчета об оценке клинических исследований (3. Клиническая эффективность, 3.8. Общее заключение эксперта по оценке клинической эффективности, 3.8.3. Данные об эффективности и дополнительные анализы).

¹⁷ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 88 «Об утверждении требований к инструкции по медицинскому применению лекарственных препаратов и общей характеристике лекарственных препаратов для медицинского применения» («Требования к инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата и общей характеристике лекарственного препарата для медицинского применения», III. Разделы ОХЛП, 5. Фармакологические свойства).

¹⁸ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 88 «Об утверждении требований к инструкции по медицинскому применению лекарственных препаратов и общей характеристике лекарственных препаратов для медицинского применения» («Требования к инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата и общей характеристике лекарственного препарата для медицинского применения», III. Разделы ОХЛП, 4. Клинические данные).

Authors' contributions. *Olga I. Basova*—elaboration of the study concept, collection and analysis of data, writing of the text; *Irina V. Lysikova*—literature review, writing of the paper and justification of its relevance; *Olga Yu. Ivanova*—writing of the text and scientific editing of the paper.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИИ 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

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

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Alosch M, Fritsch K, Huque M, Mahjoob K, Pennello G, Rothmann M, et al. Statistical considerations on subgroup analysis in clinical trials. *Stat Biopharm Res.* 2015;7(4):286–303. <https://doi.org/10.1080/19466315.2015.1077726>
2. Dane A, Spencer A, Rosenkranz G, Lipkovich I, Parke T, PSI/EFSPI Working Group on Subgroup Analysis. Subgroup analysis and interpretation for phase 3 confirmatory trials: White paper of the EFSPI/PSI working group on subgroup analysis. *Pharm Stat.* 2019;18(2):126–39. <https://doi.org/10.1002/pst.1919>
3. Millen BA, Dmitrienko A, Ruberg S, Shen L. A statistical framework for decision making in confirmatory multipopulation tailoring clinical trials. *Drug Inf J.* 2012;46(6):647–56. <https://doi.org/10.1177/0092861512454116>
4. Jones HE, Ohlssen DI, Neuenschwander B, Racine A, Branson M. Bayesian models for subgroup analysis in clinical trials. *Clin Trials.* 2011;8(2):129–43. <https://doi.org/10.1177/1740774510396933>
5. Simon R. Bayesian subset analysis: application to studying treatment-by-gender interactions. *Stat Med.* 2002;21(19):2909–16. <https://doi.org/10.1002/sim.1295>
6. Kahan BC, Jairath V, Doré CJ, Morris TP. The risks and rewards of covariate adjustment in randomized trials: an assessment of 12 outcomes from 8 studies. *Trials.* 2014;15:139. <https://doi.org/10.1186/1745-6215-15-139>
7. Ting N. Statistical interactions in a clinical trial. *Ther Innov Regul Sci.* 2018;52(1):14–21. <https://doi.org/10.1177/2168479017716491>
8. Dmitrienko A, Millen B, Lipkovich I. Multiplicity considerations in subgroup analysis. *Stat Med.* 2017;36(28):4446–54. <https://doi.org/10.1002/sim.7416>
9. Mahaffey KW, Wojdyla DM, Carroll K, Becker RC, Storey RF, Angiolillo DJ, et al. Ticagrelor compared with clopidogrel by geographic region in the Platelet Inhibition and Patient Outcomes (PLATO) trial. *Circulation.* 2011;124(5):544–54. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.111.047498>
10. Schneider L. A resurrection of aducanumab for Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2020;19(2):111–2. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(19\)30480-6](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(19)30480-6)
11. Carroll J. In a stunning turnaround, Biogen says that aducanumab does work for Alzheimer's — but data mining incites controversy and questions. *Endpointsnews.* 2019. October 22. <https://endpts.com/in-a-stunning-turnaround-biogen-says-that-aducanumab-does-work-for-alzheimers-and-theyre-prepping-a-pitch-to-the-fda/>
12. Serruys PW, Morice MC, Kappetein AP, Colombo A, Holmes DR, Mack MJ, et al. Percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass grafting for severe coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2009;360(10):961–72. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0804626>
13. Pocock SJ, Stone GW. The primary outcome fails — what next? *N Engl J Med.* 2016;375(9):861–70. <https://doi.org/10.1056/nejmra1510064>
14. Stone GW, Sabik JF, Serruys PW, Simonton CA, Généreux P, Puskas J, et al. Everolimus-eluting stents or bypass surgery for left main coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2016;375(23):2223–35. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1610227>
15. Fornell D. EXCEL trial authors say european surgery society claims of bad science are groundless. *DAIC.* 2020. January 2. <https://www.dicardiology.com/content/excel-trial-authors-say-european-surgery-society-claims-bad-science-are-groundless>
16. O'Riordan M. Former EXCEL investigator alleges trial manipulation, prompting vehement denials. *TCTMD.* 2019. October 7. <https://www.tctmd.com/news/former-excel-investigator-alleges-trial-manipulation-prompting-vehement-denials>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Басова Ольга Игоревна. *Olga I. Basova.* **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6300-2092>

Лысыкова Ирина Викторовна, канд. мед. наук. *Irina V. Lysikova, Cand. Sci. (Med.).* **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7032-5957>

Иванова Ольга Юрьевна. *Olga Yu. Ivanova.* **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1698-2670>

Статья поступила 11.09.2020

После доработки 10.02.2021

Принята к печати 31.05.2021

Article was received 11 September 2020

Revised 10 February 2021

Accepted for publication 31 May 2021

Рекомендации по программе клинических исследований лекарственных препаратов для профилактики и лечения сахарного диабета

И. А. Проскурина, Е. В. Петранева*, Д. В. Горячев

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

Резюме. Сахарный диабет представляет собой значимую проблему общественного здравоохранения, является одним из основных хронических неинфекционных заболеваний. Длительность лечения, поэтапность и необходимость индивидуального подхода при проведении терапии сахарного диабета ставят серьезные задачи перед разработчиками новых препаратов. На территории Европейского союза с 2005 г. действует централизованная процедура регистрации новых гипогликемических препаратов, что обеспечивает единство подходов к оценке их эффективности и безопасности. Цель работы — анализ актуальных требований к планированию клинических исследований гипогликемических препаратов, содержащих новые действующие вещества (исключая препараты инсулина). Рекомендации Консенсуса Европейской ассоциации по изучению сахарного диабета (EASD) и Американской диабетической ассоциации (ADA) по диагностике и лечению сахарного диабета 2 типа 2019 г. предлагают пошаговый подход к интенсификации терапии для достижения гликемической цели, который учитывает наличие у пациента сердечно-сосудистых и других заболеваний, функциональных особенностей организма. На основании проведенного анализа документов EASD/ADA и научной литературы предложены рекомендации по основным принципам планирования и проведения клинических исследований на завершающих этапах разработки гипогликемических лекарственных препаратов. Описаны новые подходы к проведению клинических исследований, позволяющие наиболее достоверно оценить эффективность терапии. Стратегия оценки терапевтического эффекта препарата должна быть тщательно спланирована, обоснована, отражена в переменных интереса, дизайне клинического исследования и статистическом анализе его результатов. Основным критерием эффективности в подтверждающих клинических исследованиях гипогликемических лекарственных препаратов должна быть демонстрация преимуществ в отношении улучшения контроля гликемии. В качестве вторичной конечной точки может рассматриваться влияние препарата на массу тела. Обязательным требованием являются подтверждение сердечно-сосудистой безопасности препарата и возможные дополнительные преимущества в отношении уменьшения риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. В протоколе клинического исследования требуется представить определение интеркуррентных событий и гипогликемии. Всестороннее изучение безопасности нового гипогликемического препарата должно включать выявление предполагаемых или известных эффектов соответствующего класса лекарственных препаратов. Представленные рекомендации могут использоваться разработчиками лекарственных препаратов, а также экспертами, осуществляющими оценку программы клинической разработки гипогликемических препаратов и экспертизу с целью регистрации.

Ключевые слова: сахарный диабет; клиническое исследование; гипогликемические лекарственные препараты; терапевтический эффект; конечные точки; популяция; интеркуррентные события

Для цитирования: Проскурина ИА, Петранева ЕВ, Горячев ДВ. Рекомендации по программе клинических исследований лекарственных препаратов для профилактики и лечения сахарного диабета. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(2):94–103. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-94-103>

* Контактное лицо: Петранева Елена Вилорьевна; petranevaev@expmed.ru

Recommendations on the Clinical Trial Programme for Diabetes Medicines

I. A. Proskurina, E. V. Petraneva*, D. V. Goryachev

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

Abstract. Diabetes is a serious public health problem and one of the major chronic noncommunicable diseases. A lengthy stepwise treatment, and the need for an individualised approach to antidiabetic therapy, pose serious challenges for medicine developers. For all new hypoglycaemic medicines, there has been a centralised authorisation procedure in the European Union (EU) since 2005, which ensures a unified approach to efficacy and safety assessment. The aim of the study was to analyse current requirements for planning clinical trials of hypoglycaemic medicines containing new active substances (except for insulin products). The recommendations for diagnosis and treatment of type 2 diabetes, prepared by the European Association for the Study of Diabetes (EASD) and the American Diabetes Association (ADA) in 2019, suggest a step-by-step approach to intensification of treatment to maintain glycaemic targets, which takes account of concomitant cardiovascular or other diseases, and clinical characteristics of patients. The analysis of EASD/ADA documents and scientific literature helped to develop recommendations on the basic principles of planning and conducting clinical trials at the final stages of hypoglycaemic medicine development. The paper describes new approaches to clinical trials, which allow for a more reliable assessment of the treatment effectiveness. The strategy for the assessment of therapeutic effect should be carefully planned, justified, and reflected in variables of interest, clinical trial design, and statistical analysis of the trial results. The main efficacy criterion in confirmatory clinical trials of hypoglycaemic medicines should be the demonstration of benefits in improving glycaemic control. The medicine's effect on the body weight may be considered as a secondary endpoint. An essential requirement is confirmation of the medicines' cardiovascular safety, while potential

additional benefits are reduction or prevention of risks of cardiovascular disease development. The clinical trial protocol should provide definitions for intercurrent events and hypoglycaemia. A comprehensive safety study of a new hypoglycaemic medicine should involve identification of anticipated or known side effects characteristic of a particular pharmacological class. The provided recommendations may be helpful for medicine developers, and for experts who perform assessment of clinical trial programmes and regulatory submissions for hypoglycaemic medicines.

Key words: diabetes; clinical trial; hypoglycaemic medicines; therapeutic effect; endpoints; population; intercurrent events

For citation: Proskurina IA, Petraneva EV, Goryachev DV. Recommendations on the clinical trial programme for diabetes medicines. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(2):94–103. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-94-103>

* **Corresponding author:** Elena V. Petraneva; petranevaev@expmed.ru

По оценкам Международной федерации диабета (International Diabetes Federation, IDF) в 2019 г. глобальная распространенность сахарного диабета (СД) составила 9,3% мирового населения (463 млн человек), к 2030 г. прогнозируется увеличение количества пациентов на 10,2% (578 млн человек) и к 2045 г. на 10,9% (700 млн человек) [1]. По данным Федерального регистра СД Российской Федерации, количество заболевших на конец 2017 г. составило около 4,5 млн человек (3,06% населения Российской Федерации), из них сахарный диабет 2 типа (СД2) был диагностирован у 4,15 млн человек (92,1%), сахарный диабет 1-го типа — у 256,1 тыс. человек (5,7%) [2].

Признание важности этого заболевания явилось причиной разработки в Европейском союзе обязательной единой централизованной процедуры подачи и одобрения новых препаратов инсулина и гипогликемических лекарственных препаратов (ГПП), содержащих новые действующие вещества. Основным критерием эффективности в подтверждающих клинических исследованиях (КИ) лекарственных препаратов для лечения СД является демонстрация преимуществ в отношении улучшения контроля гликемии. Данные о препарате подробно описываются в Европейском отчете по общественной оценке (European Public Assessment Report, EPAR), доступном на веб-сайте Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA)¹.

Развитие научных знаний в области патогенеза СД2 и появление новых классов ГПП приводят к изменению требований к оценке препаратов, содержащих новые действующие вещества. Разработчикам лекарственных средств и экспертам важно сверять свою позицию с рекомендациями международных профессиональных (Европейская ассоциация по изучению сахарного диабета (European Association on Studies of Diabetes, EASD) и Американская диабетическая ассоциация (Association on Studies of Diabetes, ADA)) и экспертных (EMA и Управление по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA)) организаций, так как разработка каждого нового препарата в перспективе может иметь глобальное

значение и повлечь за собой изменение существующих стандартов лечения СД.

Ишемическая болезнь сердца, цереброваскулярные заболевания и заболевания периферических артерий атеросклеротического происхождения, которые в совокупности называются атеросклеротическими сердечно-сосудистыми заболеваниями, являются основной причиной смертности у пациентов с СД2 [3, 4]. За последние годы был достигнут значительный прогресс в снижении риска сердечно-сосудистых (СС) исходов у пациентов с СД2. Поводом к пересмотру требований, связанных с СС безопасностью ГПП, послужили данные об увеличении на 43% риска развития инфаркта миокарда у пациентов, получавших росиглитазон, на фоне сохранения высокого риска СС заболеваний в целом.

FDA в 2008 г. выпустило рекомендации, направленные на оценку СС безопасности новых ГПП², в которых говорится, что результаты КИ препарата для лечения СД2, полученные до его регистрации, должны исключать неприемлемый СС риск, демонстрируя верхнюю границу двустороннего 95% доверительного интервала (ДИ), коэффициент риска <1,8 для комбинированной конечной точки (серьезных неблагоприятных сердечных событий (Major Adverse Cardiac Events, MACE)), состоящей как минимум из сердечно-сосудистой смерти, нефатального инфаркта миокарда и инсульта. В случае уже зарегистрированных препаратов, для которых верхняя граница ДИ находится между 1,3 и 1,8, необходимо провести пострегистрационные исследования той же комбинированной конечной точки MACE.

Результаты исследования по контролю и осложнениям при СД (Diabetes Control and Complication Trial, DCCT) показали, что достижение целевых значений гликемии приводит к снижению микрососудистых осложнений. С другой стороны, известно, что интенсивная терапия, проводимая с целью достижения нормальных значений гликемии, сопряжена с увеличением частоты гипогликемии, увеличением массы тела и общей смертности. Об этом свидетельствуют результаты исследования по контролю сердечно-сосудистого риска при СД (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD)), полученные в группе интенсивного лечения [5].

¹ <https://www.ema.europa.eu>

² Guidance for industry diabetes mellitus—evaluating cardiovascular risk in new antidiabetic therapies to treat type 2 diabetes, Docket No. FDA-2008-D-0118. FDA; 2008.

В рекомендациях ЕМА (2008 г.) появилось требование о расширении программы КИ, необходимой для одобрения новых ГПП³. После внедрения рекомендаций было отмечено значительное увеличение количества рандомизированных исследований СС исходов (Cardio-Vascular Outcome Trials, CVOT), результаты которых помогли уточнить профиль СС безопасности ГПП. На основании анализа этих данных было предложено включать частоту госпитализации по причине хронической сердечной недостаточности в качестве части первичной комбинированной конечной точки CVOT в дополнение к основным MACE [6]. Впоследствии как дополнительный первичный исход было предложено оценивать частоту госпитализации по поводу нестабильной стенокардии (4P-MACE) [7].

Результаты CVOT легли в основу алгоритмов лечения СД2, согласованных ADA и EASD [8], которые рекомендуют применять индивидуальный подход и ориентироваться на пациента, а не стремиться к стандартизации целей лечения. Фундаментом терапии по-прежнему является изменение образа жизни пациента и применение метформина в качестве первой линии терапии. Важные изменения коснулись второй и третьей линии терапии СД2: гипогликемическую терапию рекомендовано назначать с учетом сопутствующих заболеваний и индивидуальных особенностей пациента.

С 2005 г. в мире было одобрено более 40 препаратов для лечения СД2, содержащих новые действующие вещества. Одновременно были проведены КИ, связанные с СС безопасностью ранее зарегистрированных ГПП [9]. Таким образом, современный подход к оценке СС безопасности ГПП включает в себя не только предрегистрационный, но и обязательный длительный пострегистрационный период сбора данных.

Цель работы — анализ актуальных требований к планированию регистрационных КИ гипогликемических препаратов, содержащих новые действующие вещества (исключая препараты инсулина). Оценка проведена с использованием международных рекомендаций и научных публикаций, касающихся сахарного диабета 2 типа.

ЦЕЛЬ ПОДТВЕРЖДАЮЩИХ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НОВЫХ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Основной целью подтверждающих клинических исследований ГПП является оценка их терапевтического эффекта в сравнении с альтернативной терапией (отсутствие лечения или другое лечение). Терапевтический эффект нового препарата оценивается по разнице содержания гликированного гемоглобина HbA_{1c} в начале и конце исследования (или другого предварительно определенного

периода времени для оценки эффекта) в сравнении с данными, полученными в группе контроля.

При определении терапевтического эффекта важно принимать во внимание интеркуррентные события, которые могут препятствовать наблюдениям за интересующей переменной либо влиять на ее интерпретацию. Такими событиями могут быть, например, назначение «терапии спасения» или изменение фоновой гипогликемической терапии из-за непереносимости или неэффективности исследуемых препаратов (ИП). Дополнительные препараты, снижающие гликемию («терапия спасения»), назначаются по этическим соображениям пациентам с СД2, у которых в период исследования сохраняются более высокие показатели глюкозы по сравнению с целевым уровнем, указанным в протоколе. В этом случае достигнутое в конце КИ снижение гликемии будет отражать комбинированный эффект ИП и «терапии спасения».

Другими интеркуррентными событиями являются преждевременное прекращение приема, неправильный прием или пропуски в приеме ИП, летальный исход. Могут отсутствовать данные о гликемии у пациента в ключевых временных точках исследования (например, в результате пропуска измерения содержания глюкозы в крови), что может расцениваться как потеря данных для оценки. Если пациент прекращает прием препарата по причине возникновения нежелательного явления, в результатах КИ будет зафиксировано содержание глюкозы в крови на момент прекращения приема препарата, но эти данные не будут отражать эффект ИП на момент завершения исследования. Данные на момент окончания КИ будут отсутствовать в случае преждевременного прекращения приема ИП или по причине летального исхода.

Для учета результатов терапии пациентов, не достигших по указанным выше причинам окончания исследования, используется подход «последнего перенесенного наблюдения» (Last Observation Carried Forward, LOCF). Согласно этому подходу, последний результат измерения показателей глюкозы в крови, полученный перед применением «терапии спасения», прекращением приема препарата или потерей последующих данных для наблюдения, экстраполируется на окончательную оценку эффективности. Использование LOCF может привести к завышению прогнозируемого эффекта препарата, так как отсутствуют доказательства того, что результат, полученный пациентами в краткосрочном периоде, будет сохранен и в долгосрочной перспективе [10].

Выбор стратегии оценки интеркуррентных событий (табл. 1) с целью наиболее точного определения терапевтического эффекта, в свою очередь,

³ Concept paper on the need for revision of the note for guidance on clinical investigation of medicinal products in the treatment of diabetes mellitus. EMEA/CHMP/EWP/176348/2008. EMEA; 2008.

Таблица 1. Оценка терапевтического эффекта в контексте рандомизированного контролируемого клинического исследования у пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Адаптировано из [10]

Table 1. Estimands in a type 2 diabetes randomised controlled study. Adapted from [10]

Популяция исследования Study population	Первичная конечная точка Primary outcome	Стратегия оценки интеркуррентных событий Handling of intercurrent events		
		терапевтическая стратегия treatment policy estimand	гипотетическая стратегия hypothetical estimand	композиционная стратегия composite estimand
Взрослые пациенты с сахарным диабетом 2 типа, контролируемого с помощью диеты и физических упражнений Adult patients with type 2 diabetes controlled with diet and physical exercises	Изменение содержания гликированного гемоглобина от начала до окончания исследования на 26-й неделе Change in HbA1c from baseline at 26 weeks	Измерение эффекта независимо от прекращения применения исследуемого препарата или применения «терапии спасения» Measure treatment effect regardless of trial product discontinuation or use of rescue medication	Измерение эффекта у всех пациентов, продолжающих прием исследуемого препарата и не применяющих «терапию спасения» Measure effect of all patients who had continued using trial product and did not use rescue medication	Измерение различий в соотношении количества пациентов, содержание гликированного гемоглобина у которых составило 6,5% в конце исследования без применения «терапии спасения» и которые следовали режиму протокола Measure difference in proportion of patients who reached an absolute HbA1c 6.5% at the end of trial without rescue medication and who adhere to the trial product

определяет дизайн исследования, метод сбора данных и выбор метода статистического анализа [11]. Так, например, в исследовании PIONEER 4 (рандомизированное, двойное слепое исследование III фазы семаглутида для приема внутрь по сравнению с подкожным введением лираглутида и плацебо) эффективность препарата оценивали в соответствии с двумя стратегиями: терапевтической и гипотетической [12]. Терапевтическую стратегию (первичная оценка), отражающую принцип «намерения лечить» (Intention-to-Treat, ITT)⁴, определяли как эффект лечения для всех пациентов независимо от прекращения приема ИП или применения «терапии спасения». Гипотетическая стратегия определяет эффект лечения для всех пациентов, которые продолжали терапию ИП в течение всего запланированного периода исследования и не получали «терапию спасения» или не переходили на другие препараты. Прекращение приема ИП и начало применения «терапии спасения» учитываются в терапевтической и в гипотетической стратегии при оценке эффективности ИП в соответствии с ICH E9 (R1)⁵. Разница в снижении содержания HbA1c между группами лечения к окончанию исследования PIONEER 4 в соответствии с терапевтической стратегией оценки составила 0,2%, с гипотетической — 0,1% (рис. 1).

При определении целей КИ необходимо учитывать фактическую приверженность пациентов к терапии. В частности, если пациенты прекратили лечение (например, по причине развития нежелательных явлений), эффект лечения следует оценивать на основании наблюдаемых или моделируемых данных, отражающих приверженность других пациентов к лечению. Аналитический подход, включающий статистическую обработку недостающих данных, должен быть согласован с подтвержденной

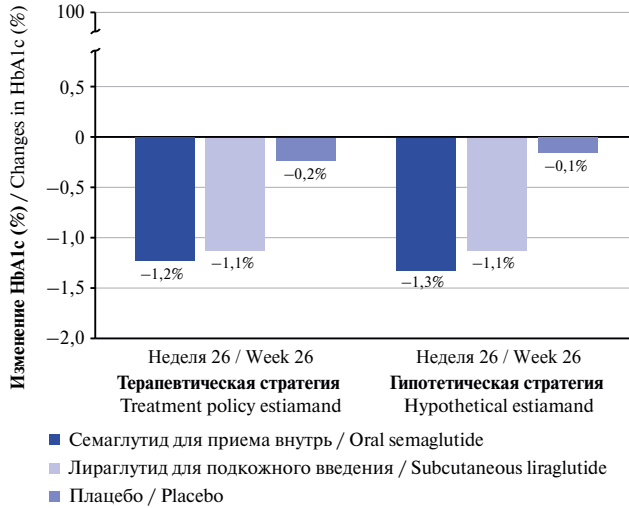


Рис. 1. Изменение HbA1c, оцененное в соответствии с различными стратегиями оценки терапевтического эффекта в исследовании PIONEER 4. Адаптировано из [12]

Fig. 1. Changes in HbA1c assessed in PIONEER 4 using two estimand strategies. Adapted from [12]

целью исследования. Данные, полученные после начала применения «терапии спасения», отражают действие «терапии спасения» самой по себе, поэтому не представляют интереса для оценки терапевтического эффекта. В случае применения «терапии спасения» может потребоваться статистическое моделирование на основании информации, полученной в группе плацебо. Это может быть приемлемым способом воспроизведения ситуации прекращения лечения и гипотетического сценария, в котором дополнительные препараты не применялись⁶. Для КИ с активным контролем и гипотезой «сравнительной эффективности» может быть принята та же первичная оценка.

⁴ ICH Topic E9. Statistical principles for clinical trials. Note for guidance on statistical principles for clinical trials. CPMP/ICH/363/96. EMEA; 1998.

⁵ ICH E9 (R1) addendum on estimands and sensitivity analysis in clinical trials to the guideline on statistical principles for clinical trials. EMA/CHMP/ICH/436221/2017. EMA; 2020.

⁶ Там же.

ОЦЕНКА ГЛИКЕМИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ

Первичная конечная точка. HbA1c — наиболее широко принятый показатель общего долгосрочного контроля глюкозы в плазме крови (ГПК) у пациентов с СД, отражающий среднюю концентрацию глюкозы в плазме крови в течение предшествующих оценке 2–3 мес. Снижение показателя HbA1c уменьшает долгосрочный риск развития микрососудистых осложнений, поэтому HbA1c признан первичной конечной точкой, которая отвечает требованиям исследования, проводимого для оценки гликемического контроля [13]. Данные по изменению HbA1c в течение 12 нед. исследования (минимально возможная продолжительность исследования) могут удовлетворять критерию первичной конечной точки, однако продолжительность и время оценки конечной точки всегда должны быть обоснованы в зависимости от типа (механизма действия) конкретного ГПП и цели исследования.

Как правило, до момента подачи досье препарата на регистрацию общая продолжительность применения препарата в рамках КИ должна составлять не менее 12 мес. Поэтому после окончания рандомизированного периода (в среднем 6 мес.), как правило, планируется продолженный открытый период исследования. В других случаях, как правило, связанных с исследованиями безопасности ГПП, заявитель должен представить соответствующую аргументацию продолжительности КИ.

Клиническую значимость полученного эффекта необходимо дополнительно обосновать путем сравнения результатов, полученных в группе пациентов, принимавших ИП, и результатов, полученных в группе сравнения. Сравнимые показатели — доля пациентов, придерживавшихся установленного режима терапии и достигших в конце исследования показателей HbA1c $\leq 7\%$ и/или $\leq 6,5\%$ без применения дополнительных препаратов. Эти результаты дают дополнительное представление о том, сколько пациентов имеют хорошую переносимость ИП и возможность прогнозировать его эффективность при практическом применении в долгосрочной перспективе. Разработчик препарата должен описать профиль пациента, ответившего на терапию (респондента), с учетом возможного длительного применения препарата [14].

В краткосрочных исследованиях (длительностью до 8 нед.), где использование HbA1c для первичной оценки эффективности менее целесообразно, могут использоваться показатели ГПК и сывороточного фруктозамина.

HbA1c следует оценивать только с помощью валидированных или эталонных методов, рекомендованных организациями, занимающимися международной стандартизацией измерения HbA1c [15]. Рекомендуется выполнять централизованную

оценку HbA1c по крайней мере в подтверждающих терапевтических исследованиях.

Вторичные конечные точки. В качестве вторичной конечной точки оценки эффективности ГПП применяется изменение ГПК натошак. Возможно использование средних значений ГПК, измеренных через равные промежутки времени (не менее семи измерений: до и после каждого из трех приемов пищи и перед сном), а также подсчет количества эпизодов ночной гипогликемии. Стратегия подхода к анализу интеркуррентных событий при оценке влияния препарата на вторичные переменные гликемического контроля может быть такой же, как и при использовании в качестве переменной HbA1c. В некоторых ситуациях следует предусмотреть проведение непрерывного мониторинга концентрации глюкозы (например, для получения информации о риске развития ночной гипогликемии), что позволит получить дополнительную информацию по действию препарата. В качестве вторичной точки также может применяться оценка снижения постпрандиальной гликемии, например после стандартизированного приема пищи. Для дополнительного обоснования результата, полученного по первичной конечной точке, может использоваться оценка количества пациентов, достигших целевого показателя HbA1c без гипогликемии.

Возможно использовать показатели содержания ГПК в капиллярной крови при условии, что есть уверенность в качестве проводимых измерений. Для описания ночных профилей концентрации глюкозы и постпрандиальной гликемии рекомендуется применять устройства, позволяющие осуществлять непрерывный мониторинг ГПК. Традиционно используемые глюкометры для подобных измерений требуют калибровки, так как показатели концентрации глюкозы в интерстициальной жидкости и в плазме крови различаются [16]. Показатели ГПК в подтверждающих исследованиях часто используются для определения пороговых значений гликемии для инициирования применения препаратов «терапии спасения». Снижение доли пациентов, которые получили «терапию спасения» и/или вышли из исследования по причине недостаточной эффективности ИП по сравнению с плацебо, может быть использовано для дополнительного доказательства эффективности ИП.

Использование в качестве суррогатных маркеров эффективности терапии снижения частоты микро- и макрососудистых осложнений, связанных с повышением чувствительности к инсулину и улучшением функции бета-клеток поджелудочной железы, пока не имеет должного научного обоснования, однако может применяться как вторичная конечная точка [17].

Полное устранение потребности в инсулине у клинически значимой доли пациентов с СД2

или снижение дозы инсулина, сопровождаемое клинически значимым снижением массы тела или снижением количества гипогликемических событий, можно рассматривать как степень эффективности ИП в дополнение к снижению или поддержанию HbA1c. Пациенты, у которых в течение исследования были значительно увеличены дозы препаратов фоновой терапии или к которым была применена «терапия спасения», классифицируются как «не ответившие на лечение».

ОЦЕНКА ФАКТОРОВ РИСКА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Краткосрочное и долгосрочное влияние ГПП на параметры, связанные с риском развития СС заболеваний (содержание липидов в сыворотке крови: холестерин липопротеидов низкой и высокой плотности, триглицериды, антропометрические параметры (масса тела, окружность талии и др.), артериальное давление и частота сердечных сокращений), должны быть должным образом зафиксированы в документах исследования. Исследуемый ГПП предпочтительно должен оказывать благоприятное или нейтральное влияние на вышеперечисленные параметры, однако прежде чем сделать вывод о возможных дополнительных преимуществах препарата в отношении риска СС заболеваний следует изучить влияние препарата на контроль гликемии. Гипертриглицеридемия, обычно отмечаемая у пациентов с СД2 и являющаяся одним из критериев включения в исследование, в большинстве случаев может улучшаться при достижении целевого гликемического контроля, и наоборот, неудовлетворительный контроль гликемии будет основным фактором развития гипертриглицеридемии [18, 19].

Долгосрочные осложнения СД2 включают развитие макрососудистых (сердечно-сосудистые, цереброваскулярные и периферические сосудистые заболевания) и микрососудистых (ретинопатия, нефропатия и нейропатия) патологий. Влияние препарата на развитие этих осложнений в целевой популяции может быть достоверно оценено только в крупномасштабных и долгосрочных контролируемых CVOT, что не является обязательным требованием при регистрации новых ЛП. Однако такие данные могут понадобиться для регистрации показателя к применению препарата в качестве монотерапии первой линии в популяции пациентов без каких-либо ограничений по сопутствующим заболеваниям [20].

Если в целевой популяции пациентов с СД подтверждено, что препарат помимо улучшения гликемического контроля способствует предотвращению развития микро- и/или макрососудистых осложнений, профилактика которых является частью концепции «лечение диабета», информация об этом может быть включена в инструкцию по медицинскому применению лекарственного препарата.

ПОПУЛЯЦИЯ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Подтверждающие клинические исследования проводятся на поздних стадиях клинической разработки для оценки отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения препарата и обоснования показаний по применению. Для получения надежных доказательств терапевтической эффективности требуется включение в КИ относительно широкой популяции пациентов с СД2, которая будет отвечать требованиям репрезентативности. Доказательства эффективности препарата считаются более надежными, если препарат оказывает заявленное действие в одинаковой степени на всю популяцию исследования в целом и на субпопуляции в рамках одного исследования (внутренняя согласованность).

Пациенты, планируемые для включения в исследование, должны представлять целевую группу населения с точки зрения демографии, этнического происхождения, продолжительности и тяжести СД2, сопутствующих заболеваний. Группы лечения должны быть сбалансированы по возрасту, полу, индексу массы тела, длительности и тяжести заболевания. Следует иметь в виду, что ответ на лечение у пациентов с СД2 может быть неоднородным, что определяется рядом факторов, которые невозможно учесть при включении пациентов в исследование [21]. Желательно применять стратификацию по параметрам исходного метаболического контроля (например, группы пациентов с HbA1c $\leq 8\%$ и HbA1c $> 8\%$), предшествующей гипогликемической терапии до включения в исследование (например, диета, монотерапия, комбинированная терапия). Исследования монотерапии оптимально проводить у пациентов на ранней стадии СД2, которые не смогли достичь гликемического контроля при помощи диеты и физических упражнений или прошли короткий курс лечения ГПП.

ДИЗАЙН ПОДТВЕРЖДАЮЩИХ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования монотерапии. Сравнение ГПП с плацебо в условиях монотерапии необходимо для оценки подлинного действия препарата, направленного на снижение гликемии, и профиля безопасности препарата. Выполнение такой оценки не зависит от того, планируется ли регистрация препарата для моно- или комбинированного применения. У пациентов с СД2 на ранней стадии заболевания должны проводиться плацебо-контролируемые КИ монотерапии продолжительностью 3–6 мес., длительность применения плацебо более 6 мес. не рекомендуется. Пациенты, планируемые для включения в эти КИ, предпочтительно должны иметь относительно низкий исходный уровень HbA1c (например, $< 8,5\%$). В протоколе исследования должны быть оговорены мероприятия,

применяемые при последовательном ухудшении контроля гликемии по сравнению с заранее установленной целью, в том числе условия начала «терапии спасения» либо исключения пациента из исследования. С одной стороны, использование строгих гликемических критериев применения «терапии спасения» может быть аргументом, позволяющим включать в исследование продолжительностью более 3 мес. пациентов с высоким исходным уровнем HbA1c, с другой стороны, это может привести к потере данных и затруднениям последующей интерпретации результатов исследования.

Если предполагается исследовать показание к применению нового ГПП в монотерапии первой линии (неограниченной) и существует информация о том, что препарат имеет выраженный и устойчивый гипогликемический эффект, то обычно проводят исследование эффективности препарата в сравнении с метформином. Профиль безопасности ГПП должен быть хорошо известен (в том числе должны существовать данные о долгосрочной безопасности и доказательства снижения микро- и/или макрососудистых рисков).

Исследования комбинированного применения («add-on» показание) препарата направлены на определение его эффективности при введении в схему терапии пациентов, не достигших гликемического контроля при стандартном лечении. Выбор новой комбинации препаратов должен быть сделан на основе рекомендаций ведущих научных обществ (ADA⁷, EASD, International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes (ISPAD)), а также информации об известных противопоказаниях к применению некоторых комбинаций. Для регистрации препарата по показанию к применению «дополнение к другим ГПП» следует представить данные по эффективности стандартных комбинаций препаратов. Кроме того, должны быть исследованы потенциально небезопасные комбинации препаратов (например, способные вызвать гипогликемию). Результаты исследований комбинированного применения должны быть отражены в инструкции по медицинскому применению препарата. В исследованиях комбинированной терапии необходимо использовать группу активного контроля или плацебо.

В исследование могут быть включены:

- пациенты, лечение которых по стандартной схеме с применением препаратов в максимально переносимой или рекомендуемой дозе не привело к желаемому результату. Пациенты, получавшие иную моно- или комбинированную терапию, перед включением в КИ могут быть переключены на стандартную монотерапию (фоновое лечение) на 8–12 нед. В том случае если терапевтические цели в течение 8–12 нед. не достигнуты, пациента включают в исследование либо в группу, получающую

ИП в дополнение к фоновой терапии, либо в группу плацебо/активного контроля. Пациентов, включенных в исследование, необходимо стратифицировать в зависимости от предшествующего лечения;

- пациенты, принимавшие стабильные дозы ГПП с целью снижения гликемии и стабилизации HbA1c в течение 8–12 нед., предшествовавших началу КИ. Для достижения максимального эффекта снижения гликемии с помощью некоторых препаратов может потребоваться более 12 нед.

При комбинированном применении ГПП дозу фонового препарата на протяжении всего исследования не меняют, если это не является необходимым с точки зрения безопасности. Дозу ИП подбирают методом титрования. В период КИ дозы ИП и препарата сравнения должны быть стабильными.

Если пациенты не достигают контроля гликемии при применении неинсулиновых ГПП, эти препараты отменяют и иницируют терапию препаратами инсулина [8]. В некоторых случаях, например при частых и тяжелых эпизодах гипогликемии, препятствующих достижению целевого гликемического контроля, или при инсулининдуцированном увеличении массы тела, комбинация препаратов инсулина и ГПП может дать дополнительные преимущества. Наиболее часто применяемой комбинацией препаратов являются препараты инсулина в сочетании с метформином [22].

Комбинированную терапию с ИП следует применять для пациентов с СД2, не достигающих контроля при монотерапии инсулином в адекватных дозах или при комбинированной терапии инсулином с иным ГПП, обычно метформином, или двумя ГПП. Пациенты должны быть стратифицированы по получаемому лечению. Группы лечения должны быть однородны по отношению к режимам применения препарата инсулина (например, базальный, базально-болюсный режим). Для моделирования популяции пациентов с СД2, получающих инсулин в реальной практике, в исследуемую популяцию должны быть включены пациенты с широким диапазоном индекса массы тела, существенную долю должны представлять пациенты с длительным анамнезом СД (например, ≥10 лет), а также пожилые пациенты. После периода стабилизации дозы «инсулин + метформин» (как правило, составляет 8 нед.) подходящие по критериям пациенты должны быть рандомизированы в группы, получающие ИП или плацебо, на период не менее 26 нед. Как правило, пациенты продолжают получать стабильную дозу препаратов фонового лечения, если только нет необходимости в снижении их дозы с точки зрения безопасности пациента (прежде всего снижения дозы инсулина из-за гипогликемии). Для предотвращения возможных длительных периодов неудовлетворительного контроля гликемии заранее должны

⁷ <https://professional.diabetes.org/content-page/practice-guidelines-resources>

быть определены критерии применения «терапии спасения».

Основная цель исследования состоит в демонстрации превосходства применения ИП перед плацебо в снижении HbA1c. Вторичные конечные точки должны среди прочего включать частоту эпизодов гипогликемии, в том числе серьезной гипогликемии, изменение массы тела и дозы инсулина, а также долю пациентов, достигших целевого показателя HbA1c без гипогликемии. Например, основная цель исследования SCALE, в котором изучалось добавление лираглутида к терапии базальным инсулином у пациентов с СД2 с повышенной массой тела или ожирением, которые ранее получали терапию базальным инсулином и одним или двумя ГПП, состояла в оценке влияния лираглутида на массу тела пациентов по сравнению с плацебо при поддержании или улучшении достигнутого контроля гликемии [23].

Исследования в особых популяциях. Цели лечения СД у пожилых пациентов, как и у более молодых пациентов, включают контроль гликемии и снижение СС риска. Гериатрическая популяция отличается большей неоднородностью, чем популяция пациентов с СД2 в целом, поэтому при проведении исследований необходимо учитывать наличие сопутствующих заболеваний, макро- и микрососудистых осложнений и полипрагмазию, а также возможные особенности фармакокинетики препарата у пожилых пациентов. Таким образом, для оценки сопоставимости терапевтического эффекта и профиля безопасности (особенно вероятности развития гипогликемии) у пациентов в этих популяциях разработчику необходимо представить данные по применению препарата в разных возрастных группах. В зависимости от имеющихся данных могут потребоваться дополнительные исследования эффективности и безопасности у пожилых пациентов [24].

Распространенность СД2 у детей и подростков коррелирует с распространенностью ожирения в этой возрастной группе [25]. Из-за потенциальных различий протекания заболевания в популяциях детей/подростков и взрослых (более быстрое снижение функции бета-клеток поджелудочной железы), специфики педиатрической популяции (процессы пубертатного развития, рост, развитие костей, нейрокогнитивное развитие и т.д.) рекомендуется проводить независимые педиатрические исследования. Частота и распространенность СД2 у детей ≤ 10 лет низкая, средний возраст развития СД2 составляет 13–14 лет, поэтому рекомендуется включать в КИ пациентов в возрасте 10–18 лет.

БЕЗОПАСНОСТЬ НОВЫХ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Особые усилия должны быть предприняты для выявления потенциальных нежелательных реакций, связанных с механизмом действия и фармакодинамическими свойствами класса, к которому

относится новый препарат. Изучение безопасности применения препарата может включать исследование возможного влияния на иммунный статус, стимулирующее влияние на рост новообразований, развитие инфекционных заболеваний и воспалительных процессов (например, панкреатит). С помощью одних только исследований комбинированного применения («add-on») невозможно окончательно оценить истинный профиль безопасности нового препарата. Почти всегда присутствуют фармакодинамические взаимодействия с другими гипогликемическими лекарственными средствами. Не всегда возможно определить относительный вклад других параметров (фармакокинетические взаимодействия, аддитивные токсические эффекты и др.) в наблюдаемый эффект. Следовательно, в дополнение к результатам, полученным в исследованиях комбинированного применения, важно иметь данные о безопасности применения нового ГПП, полученные в условиях монотерапии.

Эпизоды тяжелой гипогликемии при СД2, связанной с выраженной дисфункцией центральной нервной системы, встречаются крайне редко, но они могут иметь особое значение для детей/подростков и пожилых людей. В протоколе КИ должно быть указано стандартное определение тяжелых и менее тяжелых эпизодов гипогликемии с описанием симптомов, а также пороговая концентрация глюкозы, определяемая по результатам самоконтроля. Гипогликемия должна быть подтверждена путем измерения концентрации глюкозы в капиллярной крови или плазме.

В отчете о клиническом исследовании следует предоставлять подробный анализ эпизодов гипогликемии, которые были отмечены в период исследования (например, анализ в группах пациентов, стратифицированных по возрасту: ≤ 65 , >65 , >75 лет; хронометраж эпизодов по отношению к времени действия препарата, времени суток). Для каждого эпизода гипогликемии необходимо указывать время его начала, время, прошедшее после последнего приема препарата и после приема пищи, степень тяжести эпизода, его продолжительность, исход, дозу принимаемого препарата. При применении препаратов, способных вызывать гипогликемию, а также для групп пациентов с повышенным риском развития гипогликемии следует предусмотреть возможность проведения измерений концентрации глюкозы в ночное время. Непрерывный мониторинг концентрации глюкозы дает более полную информацию о гликемическом профиле в течение ночи.

Программа разработки ЛП должна содержать клинические и доклинические исследования, позволяющие получить данные, характеризующие риски, связанные с СС системой. В частности, это относится к препаратам с новым механизмом действия или препаратам, для которых профиль СС

безопасности еще не установлен или поставлен под сомнение⁸. Если новый ГПП представляет собой белок, необходимо отслеживать образование специфических антител и изменение их титра с течением времени. Иммуногенность оценивается с учетом положений руководства⁹.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в работе рекомендации отражают основные принципы планирования и проведения клинических исследований на завершающих этапах разработки ГПП (исключая препараты инсулина).

Выбор популяции пациентов определяется общепризнанными алгоритмами диагностики и лечения СД2, которые разрабатываются и утверждаются ведущими международными экспертными организациями. При проведении подтверждающих клинических исследований необходимо иметь достаточные обоснования не только гипогликемического действия препарата, но и информацию по его влиянию на СС риски и заболевания. Дизайн исследования должен отвечать современным общепринятым концепциям доказательной медицины и представлять собой рандомизированное двойное слепое контролируемое исследование. Особое внимание следует уделить необходимости соблюдения пациентами рекомендаций по питанию и уровню физической активности.

Длительность исследования должна составлять не менее 12 нед., так как это обеспечивает оценку эффективности нового ГПП по первичной конечной точке, которая определяется по изменению показателя HbA1c. Для регистрации препарата требуются результаты более продолжительного исследования, как правило, до 1 года, что позволяет оценить долгосрочный устойчивый эффект препарата по отношению к снижению концентрации глюкозы в крови и получить требуемые данные по безопасности применения препарата.

В лечении СД2, как правило, применяются комбинации ГПП (с инсулином или без него), поэтому перед началом планирования КИ комбинированного применения препарата должны быть в большей мере известны эффекты фармакологического взаимодействия препаратов.

Следует отметить, что фактор гетерогенности популяции пациентов с СД2 может препятствовать

получению ожидаемого терапевтического ответа на применение нового препарата. Еще одной особенностью являются исследования в особых популяциях пациентов, прежде всего у пожилых. Эта категория пациентов является крайне неоднородной, даже на фоне общей гетерогенности популяции СД2 в связи с наличием сопутствующих заболеваний и полипрагмазии.

Развитие экспертных подходов к оценке новых препаратов для лечения СД2 требует постоянного мониторинга научных публикаций и международных рекомендаций. В случае обновления международных рекомендаций и стандартов лечения может потребоваться уточнение информации, касающейся этапа клинической разработки.

Настоящие рекомендации будут необходимы для экспертов, проводящих оценку программы клинической разработки гипогликемических препаратов, экспертизу с целью регистрации, а также для разработчиков лекарственных препаратов.

Вклад авторов. И. А. Проскурина — утверждение содержания статьи, редактирование; Е. В. Петранева — написание текста, внесение правок, редактирование, взаимодействие с редакцией, подготовка варианта для публикации, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; Д. В. Горячев — разработка концепции, критический пересмотр текста, утверждение варианта для публикации.

Authors' contributions. Irina A. Proskurina—approval of the paper contents, editing of the text; Elena V. Petraneva—writing of the text, making corrections, editing of the text, interaction with the editors, preparation of the final version of the paper for publication; Dmitry V. Goryachev—elaboration of the study concept, revision of the text, approval of the final version of the paper.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Конфликт интересов. Д. В. Горячев является членом редакционной коллегии журнала «Вестник НЦЭСМП», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Dmitry V. Goryachev is a member of the Editorial Board of *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*, the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;157:107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>
2. Дедов ИИ, Шестакова МВ, Викулова ОК, Железнякова АВ, Исаков МА. Сахарный диабет в Российской Федерации: распространенность, заболеваемость, смертность, параметры углеводного обмена и структура сахароснижающей терапии по данным федерального регистра сахарного диабета, статистика 2017. *Сахарный диабет.* 2018;21(3):144–59. [Dedov II, Shestakova MV, Vikulova OK,

⁸ Reflection paper on assessment of cardiovascular safety profile of medicinal products. EMA/CHMP/50549/2015. EMA; 2016.

⁹ Guideline on Immunogenicity assessment of therapeutic proteins. EMEA/CHMP/BWP/14327/2006 Rev 1. EMEA; 2017.

- Zheleznyakova AV, Isakov MA. Diabetes mellitus in Russian Federation: prevalence, morbidity, mortality, parameters of glycaemic control and structure of glucose lowering therapy according to the Federal Diabetes Register, status 2017. *Sakharny diabet = Diabetes Mellitus*. 2018;21(3):144–59 (In Russ.). <https://doi.org/10.14341/DM9686>
3. American Diabetes Association. 9. Cardiovascular disease and risk management: Standards of medical care in diabetes–2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S86–S104. <https://doi.org/10.2337/dc18-S009>
4. Sharma A, Green JB, Dunning A, Lokhnygina Yu, Al-Khatib SM, Lopes RD, et al. Causes of death in a contemporary cohort of patients with type 2 diabetes and atherosclerotic cardiovascular disease: insights from the TECOS trial. *Diabetes Care*. 2017;40(12):1763–70. <https://doi.org/10.2337/dc17-1091>
5. Ismail-Beigi F. Action to control cardiovascular risk in diabetes (ACCORD) trial—clinical implications. *Clin Chem*. 2011;57(2):261–3. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.148288>
6. Skyler JS, Bergenstal R, Bonow RO, Buse J, Deedwania P, Gale EAM, et al. Intensive glycaemic control and the prevention of cardiovascular events: Implications of the ACCORD, ADVANCE, and VA Diabetes Trials. *Diabetes Care*. 2009;32(1):187–92. <https://doi.org/10.2337/dc08-9026>
7. McMurray JJ, Gerstein HC, Holman RR, Pfeffer MA. Heart failure: a cardiovascular outcome in diabetes that can no longer be ignored. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(10):843–51. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70031-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70031-2)
8. Buse JB, Wexler DJ, Tsapas A, Rossing P, Mingrone G, Mathieu C, et al. 2019 Update to: management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2020;43(2):487–93. <https://doi.org/10.2337/dci19-0066>
9. Blind E, Janssen H, Dunder K, de Graeff PA. The European Medicines Agency's approval of new medicines for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20(9):2059–63. <https://doi.org/10.1111/dom.13349>
10. Min T, Bain SC. Estimands in diabetes clinical trials. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8(3):181–3. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30407-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30407-3)
11. Aroda VR, Saugstrup T, Buse JB, Donsmark M, Zacho J, Davies MJ. Incorporating and interpreting regulatory guidance on estimands in diabetes clinical trials: The PIONEER 1 randomized clinical trial as an example. *Diabetes Obes Metab*. 2019;21(10):2203–10. <https://doi.org/10.1111/dom.13804>
12. Pratley R, Amod A, Hoff ST, Kadowaki T, Lingvay I, Nauck M, et al. Oral semaglutide versus subcutaneous liraglutide and placebo in type 2 diabetes (PIONEER 4): a randomised, double-blind, phase 3a trial. *Lancet*. 2019;394(10192):39–50. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31271-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31271-1)
13. Bergenstal RM. Glycemic variability and diabetes complications: Does it matter? Simply put, there are better glycemic markers! *Diabetes Care*. 2015;38(8):1615–21. <https://doi.org/10.2337/dc15-0099>
14. Cantrell RA, Alatorre CI, Davis EJ, Zarotsky V, Le Nestour E, Cuyún Carter G, et al. A review of treatment response in type 2 diabetes: assessing the role of patient heterogeneity. *Diabetes Obes Metab*. 2010;12(10):845–57. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01248.x>
15. Gupta S, Jain U, Chauhan N. Laboratory Diagnosis of HbA1c: A review. *J Nanomed Res*. 2017;5(4):00120. <https://doi.org/10.15406/jnmr.2017.05.00120>
16. Siegmund T, Heinemann L, Kolassa R, Thomas A. Discrepancies between blood glucose and interstitial glucose—technological artifacts or physiology: implications for selection of the appropriate therapeutic target *J Diabetes Sci Technol*. 2017;11(4):766–72. <https://doi.org/10.1177/1932296817699637>
17. Cernea S, Dobreanu M. Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications. *Biochem Med (Zagreb)*. 2013;23(3):266–80. <https://doi.org/10.11613/BM.2013.033>
18. Hartz JC, de Ferranti S, Gidding S. Hypertriglyceridemia in diabetes mellitus: implications for pediatric care. *J Endocr Soc*. 2018;2(6):497–512. <https://doi.org/10.1210/je.2018-00079>
19. Thomsen M, Varbo A, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Low nonfasting triglycerides and reduced all-cause mortality: a mendelian randomization study. *Clin Chem*. 2014;60(5):737–46. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.219881>
20. Schnell O, Standl E, Catrinou D, Itzhak B, Lalic N, Rahelic D, et al. Report from the 4th Cardiovascular Outcome Trial (CVOT) Summit of the Diabetes & Cardiovascular Disease (D&CVD) EASD Study Group. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18(1):30. <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0822-4>
21. Cantrell RA, Alatorre CI, Davis EJ, Zarotsky V, Le Nestour E, Cuyún Carter G, et al. A review of treatment response in type 2 diabetes: assessing the role of patient heterogeneity. *Diabetes Obes Metab*. 2010;12(10):845–57. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01248.x>
22. Bailey CJ. Diabetes: insulin plus metformin for T2DM—are there benefits? *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(8):449–50. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.106>
23. Garvey WT, Birkenfeld AL, Dicker D, Mingrone G, Pedersen SD, Satylganova A, et al. Efficacy and safety of Liraglutide 3.0 mg in individuals with overweight or obesity and type 2 diabetes treated with basal insulin: The SCALE insulin randomized controlled trial. *Diabetes Care*. 2020;43(5):1085–93. <https://doi.org/10.2337/dc19-1745>
24. Yakaryılmaz FD, Öztürk ZA. Treatment of type 2 diabetes mellitus in the elderly. *World J Diabetes*. 2017;8(6):278–85. <https://doi.org/10.4239/wjd.v8.i6.278>
25. Reinehr T. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *World J Diabetes*. 2013;4(6):270–81. <https://doi.org/10.4239/wjd.v4.i6.270>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Проскурина Ирина Анатольевна, канд. мед. наук. *Irina A. Proskurina*, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0934-5067>

Петранева Елена Вилорьевна, канд. мед. наук. *Elena V. Petraneva*, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7400-8289>

Горячев Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук. *Dmitry V. Goryachev*, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8583-2372>

Статья поступила 21.09.2020

После доработки 15.03.2021

Принята к печати 31.05.2021

Article was received 21 September 2020

Revised 15 March 2021

Accepted for publication 31 May 2021

Определение антраценпроизводных соединений в лекарственных средствах растительного происхождения

О. В. Евдокимова, А. В. Бекетова, М. Н. Лякина*

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. Актуальность проводимых исследований обусловлена необходимостью унификации методов, применяемых для установления подлинности и количественного определения антраценпроизводных соединений в ряду от фармацевтической субстанции растительного происхождения до лекарственных препаратов растительного происхождения. Цель работы — на основе обзора зарубежных и отечественных стандартов качества выявить наиболее специфичные и чувствительные методы анализа лекарственных средств растительного происхождения, содержащих антраценпроизводные. В результате сравнительного анализа требований разделов «Идентификация», «Определение основных групп биологически активных веществ» и «Количественное определение» статей отечественной и зарубежных фармакопей на фармацевтические субстанции и лекарственные препараты растительного происхождения, содержащие антраценпроизводные соединения, показано, что основным методом установления подлинности (идентификации) является метод тонкослойной хроматографии, а количественного определения — спектрофотометрический метод. Принцип сквозной стандартизации прослеживается в отечественных стандартах качества в методиках определения антраценпроизводных соединений в фармацевтических субстанциях и в лекарственных препаратах, полученных на их основе. В результате проведенного сравнительного анализа требований зарубежных и отечественных стандартов качества на лекарственные средства растительного происхождения, содержащие антраценпроизводные соединения, выявлена целесообразность разработки общих фармакопейных статей «Методы качественного анализа антраценпроизводных соединений в лекарственных средствах растительного происхождения» и «Методы количественного определения антраценпроизводных соединений в лекарственных средствах растительного происхождения».

Ключевые слова: антраценпроизводные соединения; идентификация; количественное определение; фармацевтические субстанции растительного происхождения; лекарственные растительные препараты; лекарственные средства растительного происхождения; стандартизация; государственная фармакопея

Для цитирования: Евдокимова ОВ, Бекетова АВ, Лякина МН. Определение антраценпроизводных соединений в лекарственных средствах растительного происхождения. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(2):104–114. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-104-114>

* **Контактное лицо:** Лякина Марина Николаевна; Ljakina@expmed.ru

Determination of Anthracene Derivatives in Herbal Medicines

O. V. Evdokimova, A. V. Beketova, M. N. Lyakina*

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

Abstract. The relevance of this study stems from the need for alignment of test methods used for identification and assay of anthracene derivatives in herbal preparations and herbal medicinal products. The aim of the study was to analyse Russian and international quality standards and to identify the most specific and sensitive test methods that could be used for herbal medicines containing anthracene derivatives. The comparative analysis of requirements in the *Identification*, *Determination of major classes of bioactive compounds*, and *Assay* parts of the Russian and foreign pharmacopoeial monographs for herbal preparations and herbal medicinal products containing anthracene derivatives, demonstrated that the main test method used for identification is thin layer chromatography, while assays most often rely on spectrophotometry. The so-called “consistent standardisation” principle is implemented in the Russian quality standards as regards alignment of methods used for anthracene derivative determination in herbal preparations (i.e. active pharmaceutical ingredients, APIs) and herbal medicinal products containing these APIs. The comparative analysis of requirements in the Russian and foreign quality standards for herbal medicines containing anthracene derivatives demonstrated the need for elaboration of two general chapters: *Qualitative analysis of anthracene derivatives in herbal medicines* and *Quantitative analysis of anthracene derivatives in herbal medicines*.

Key words: anthracene derivatives; identification; assay; herbal preparations; herbal medicinal products, herbal medicines; standardisation; State Pharmacopoeia

For citation: Evdokimova OV, Beketova AV, Lyakina MN. Determination of anthracene derivatives in herbal medicines. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(2):104–114. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-104-114>

* **Corresponding author:** Marina N. Lyakina; Ljakina@expmed.ru

В действующий в России Государственный реестр лекарственных средств включено свыше 280 видов фармацевтических субстанций растительного происхождения (ФСРП) и более 700 лекарственных препаратов на их основе. Особое место среди них занимают лекарственные средства на основе растений, содержащих антраценпроизводные соединения, характеризующиеся широким спектром фармакологического действия: слабительным, мочегонным, желчегонным, спазмолитическим, нефролитическим, антибактериальным, дерматологическим, фотосенсибилизирующим, стимулирующим, регенерирующим и др. [1–6]. Столь широкий спектр фармакологических свойств антраценпроизводных соединений обусловлен разнообразием их строения. Антраценпроизводные соединения — группа природных фенольных соединений, в основе которых лежит ядро антрацена различной степени окисленности по среднему кольцу [7].

В зависимости от структуры углеродного скелета природные производные антрацена можно разделить на 3 основные группы: мономерные соединения, содержащие одно ядро антрацена; димерные соединения, в основе которых два ядра антрацена, и конденсированные соединения с двумя и более ядрами антрацена. Мономерные соединения встречаются в подземных органах марены (кислота руберитриновая), ревеня дланевидного и щавеля конского (реум-эмодин), коре крушины ломкой (франгулаэмодин, франгулин, глюкофрангулин), листьях сенны (реин), побегах и листьях алоэ древовидного (алоэ-эмодин). Димерные соединения выделены из листьев сенны (сеннозиды А и Б), а конденсированные — из травы зверобоя (гиперицин) и гречихи (фагопирин). Строение антраценпроизводных соединений обуславливает особенности их анализа [7].

Цель работы — на основе обзора зарубежных и отечественных стандартов качества выявить наиболее специфичные и чувствительные методы анализа лекарственных средств растительного происхождения, содержащих антраценпроизводные.

В настоящее время в Государственную фармакопею Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ) включены шесть фармакопейных статей (ФС) на ФСРП, для которых предусмотрена стандартизация по антраценпроизводным соединениям. Кроме того, разработаны проекты еще трех ФС на фармацевтические субстанции, в которые включено определение антраценпроизводных соединений (табл. 1, 2).

Анализ фармакопейных стандартов и монографий отечественной и зарубежных фармакопей¹ свидетельствует о том, что некоторые виды ФСРП упомянуты только в отечественной фармакопее, например, в ФС.2.5.0014.15 Жостера слабительного плоды и ФС.2.5.0052.18 Щавеля конского корни. Только для ГФ РФ разработаны проекты фармакопейных статей «Алоэ древовидного побеги свежие», «Алоэ древовидного листья свежие» и «Алоэ древовидного листья», а ФС/монографии «Крушины ольховидной кора», «Марены корневища и корни», «Ревеня дланевидного корни» и «Сенны листья» включены как в ГФ РФ², так и в некоторые зарубежные фармакопеи (табл. 1).

По требованиям большинства нормативных документов установление подлинности ФСРП по наличию антраценпроизводных соединений проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием стандартных образцов (СО) (что обеспечивает специфичность ТСХ-методик). Согласно некоторым нормативным документам, для подтверждения подлинности требуется проведение качественных реакций в дополнение к ТСХ или (реже) как основного метода анализа. Отдельные методики, включенные в фармакопейные статьи ГФ РФ, гармонизированы с требованиями монографий зарубежных фармакопей. Так, в монографии «Крушины кора» Государственной фармакопеи Республики Беларусь³ и в монографии «Крушины ольховидной кора» Европейской фармакопеи⁴ приведены схожие методики анализа с использованием СО барбалоина (алоина), позволяющие не только идентифицировать фармацевтические субстанции, но и подтвердить отсутствие недопустимых органических примесей — близкородственных видов растений.

Оценку содержания антраценпроизводных соединений в ФСРП проводят в основном спектрофотометрическим методом в видимой области спектра. Анализ может проводиться как прямым методом, так и косвенным, основывающимся на определении продуктов реакции с солями тяжелых металлов [7]. В ряде случаев в монографиях ведущих фармакопей мира на отдельные виды ФСРП приведены методики количественного определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Разрабатываемые проекты ФС на лекарственные растительные препараты, реализуемые в расфасованном виде во вторичной (потребительской) упаковке, предполагают приведение показателей

¹ European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg: EDQM; 2020.

Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 1–3. Минск: Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении; 2009.

Japanese Pharmacopoeia. 16th ed. Tokyo: Hirokawa Shoten; 2011.

United States Pharmacopoeia. USP 43–NF 38. Rockville, MD; 2019.

² ФС.2.5.0021.18 Крушины ольховидной кора; ФС.2.5.0083.18 Марены корневища и корни; ФС.2.5.0092.18 Ревеня дланевидного корни; ФС.2.5.0038.15 Сенны листья. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. IV. М.; 2018.

³ Крушины кора. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 2. Минск: Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении; 2009.

⁴ Monograph 04/2011:0025 Frangula bark. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg: EDQM; 2020.

Таблица 1. Показатели качества фармацевтических субстанций растительного происхождения, стандартизуемых по антраценпроизводным соединениям, и методы их определения в соответствии с требованиями отечественной и зарубежных фармакопей

Table 1. Test parameters and test methods used in different pharmacopoeias for quality control of herbal preparations containing anthracene derivatives

Наименование фармацевтиче- ских субстанций растительного происхождения Herbal preparation	Раздел ФС/ монографии Part of the monograph	Методы определения показателей по различным фармакопеям Test methods and test parameters given in different pharmacopoeias					
		Проекты ФС ГФ РФ Ph. Rus. draft monograph	ГФ РФ Ph. Rus.	ГФ РБ Ph. Bel.	Европейская фармакопея Ph. Eur.	Фармакопея США USP	Японская фар- макопея JP
Жостера слабительного плоды European buck-thorn fruit	Определение основ- ных групп биологиче- ски активных веществ Determination of ma- jor classes of bioactive compounds	—	ТСХ: СО — 3-О-рутинозид рамнетина и франгулин А TLC using rhamnetin-3-O- rutinoside RS and frangulin A RS	—	—	—	—
	Количественное определение Assay	—	СФ: сумма антраценпро- изводных в пересчете на франгулин А Spectrophotometry: total anthracene derivatives, expressed as frangulin A	—	—	—	—
Крушины ольхо- видной кора Frangula bark	Определение основ- ных групп биологиче- ски активных веществ Determination of ma- jor classes of bioactive compounds	—	ТСХ: СО — барбалоин (алоин); качественная реакция TLC using barbaloin RS (aloin); identification test	ТСХ: СО — барбалоин (алоин); качественная реакция TLC using barbaloin RS (aloin); identification test	ТСХ: СО — барбалоин (алоин); качественная реакция TLC using barbaloin RS (aloin); identification test	—	—
	Количественное определение Assay	—	СФ: сумма антрагли- козидов в пересчете на глюкофрангулин А Spectrophotometry: total anthraglycosides, expressed as glucofrangulin A	СФ: сумма глюкофрангулинов в пересчете на глюкофрангу- лин А Spectrophotometry: total glucofrangulins, expressed as glucofrangulin A	СФ: сумма глюкофран- гулинов в пересчете на глюкофрангулин А Spectrophotometry: total glucofrangulins, expressed as glucofran- gulin A	—	—
Марены корневид- ная и корни Madder rhizome and root	Определение основ- ных групп биологиче- ски активных веществ Determination of ma- jor classes of bioactive compounds	—	ТСХ; качественная реакция TLC; identification test	Качественная реакция Identification test	—	—	—
	Количественное определение Assay	—	СФ: связанные произво- дные антрацена Spectrophotometry: bound anthracene derivatives	СФ: связанные производные антрацена Spectrophotometry: bound anthracene derivatives	—	—	—

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Наименование фармацевтических субстанций растительного происхождения Herbal preparation	Раздел ФС/монографии Part of the monograph	Методы определения показателей по различным фармакопеям Test methods and test parameters given in different pharmacopoeias					
		Проекты ФС Ph. Rus. draft monograph	ГФ РФ Ph. Rus.	ГФ РБ Ph. Bel.	Европейская фармакопея Ph. Eur.	Фармакопея США USP	Японская фармакопея JP
Ревеня дланевидного корня Rhubarb root	Определение основных групп биологически активных веществ Determination of major classes of bioactive compounds	—	ТСХ: СО — франгулаэмодин TLC using frangulaemodin RS	ТСХ: СО — эмодин; качественная реакция TLC using emodin RS, identification test	ТСХ: СО — эмодин; качественная реакция TLC using emodin RS, identification test	—	ТСХ: СО — реин TLC using rehin RS
	Количественное определение Assay	—	СФ: сумма производных антрацена в пересчете на франгулаэмодин Spectrophotometry: total anthracene derivatives, expressed as frangulaemodin	СФ: сумма гидроксиантрацен-производных в пересчете на реин; сумма производных антрацена в пересчете на истизин Spectrophotometry: total hydroxyanthracene derivatives, expressed as rehin; total content of anthracene derivatives, expressed as istizin	СФ: сумма гидроксиантраценпроизводных в пересчете на реин Spectrophotometry: total hydroxyanthracene derivatives, expressed as rehin	—	ВЭЖХ: содержание сеннозида А HPLC: content of sennoside A
Сенны листья Senna leaf	Определение основных групп биологически активных веществ Determination of major classes of bioactive compounds	—	ТСХ: СО — сеннозид Б и барбалол; качественная реакция TLC using sennoside B RS and barbaloin RS; identification test	ТСХ: СО — стандартизованный экстракт сенны листьев; качественная реакция TLC using senna leaf standardised extract; identification test	ТСХ: СО — стандартизованный экстракт сенны листьев; качественная реакция TLC using senna leaf standardised extract; identification test	Качественная реакция Identification test	ТСХ: СО — сеннозид А; качественная реакция TLC using sennoside A RS; identification test
	Количественное определение Assay	—	СФ: сумма агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту Spectrophotometry: total anthracene aglycones, expressed as chrysophanic acid	СФ: сумма гидроксиантраценгликозидов в пересчете на сеннозид Б Spectrophotometry: total hydroxyanthracene glycosides, expressed as sennoside B	СФ: сумма гидроксиантраценгликозидов в пересчете на сеннозид Б Spectrophotometry: total hydroxyanthracene glycosides, expressed as sennoside B	СФ: сумма антрагликозидов в пересчете на сеннозиды Spectrophotometry: total anthraglycosides, expressed as sennosides	ВЭЖХ: сумма сеннозидов (сеннозид А и сеннозид Б) HPLC: total sennosides (sennoside A and sennoside B)
Щавеля конского корня Horse sorrel root	Определение основных групп биологически активных веществ Determination of major classes of bioactive compounds	—	ТСХ: СО — 8-О-β-D-глюкозид эмодина TLC using emodin-8-O-β-D-glucoside RS	—	—	—	—

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Наименование фармацевтических субстанций растительного происхождения Herbal preparation	Раздел ФС/ монографии Part of the monograph	Методы определения показателей по различным фармакопеям Test methods and test parameters given in different pharmacopoeias					
		Проекты ФС ГФ РФ Ph. Rus. draft monograph	ГФ РФ Ph. Rus.	ГФ РБ Ph. Bel.	Европейская фармакопея Ph. Eur.	Фармакопея США USP	Японская фар-макопея JP
Щавеля конского корни Horse sorrel root	Количественное определение Assay	—	СФ: сумма антраценпро-изводных в пересчете на 8-О-β-D-глюкозилэмодин Spectrophotometry: total anthracene derivatives, expressed as emodin-8-O-β-D-glucoside RS	—	—	—	—
Алоэ древовидно-го побего свежие Candelabra aloe fresh sprout	Определение основ-ных групп биологиче-ски активных веществ Determination of ma-jor classes of bioactive compounds	ТСХ: СО — алоэ-эмодин; качественная реакция TLC using aloe emodin RS; identification test	—	—	—	—	—
	Количественное определение Assay	СФ: сумма ан-траценпроиз-водных в соке в пересчете на алоэ-эмодин Spectropho-metry: total anthracene de-rivatives in the juice, expressed as aloe emodin	—	—	—	—	—
Алоэ древовидно-го листья свежие Candelabra aloe fresh leaf	Определение основ-ных групп биологиче-ски активных веществ Determination of ma-jor classes of bioactive compounds	ТСХ: СО — алоэ-эмодин; качественная реакция TLC using aloe emodin RS; identification test	—	—	—	—	—

Продолжение таблицы 1
 Table 1 (continued)

Наименование фармацевтических субстанций растительного происхождения Herbal preparation	Раздел ФС/монографии Part of the monograph	Методы определения показателей по различным фармакопеям Test methods and test parameters given in different pharmacopoeias					
		Проекты ФС ГФ РФ Ph. Rus. draft monograph	ГФ РФ Ph. Rus.	ГФ РБ Ph. Bel.	Европейская фармакопея Ph. Eur.	Фармакопея США USP	Японская фармакопея JP
Алоэ древовидного листа свежие Candelabra aloe fresh leaf	Количественное определение Assay	СФ: сумма антраценпроизводных в соке в пересчете на алоэ-эмодин Spectrophotometry: total anthracene derivatives in the juice, expressed as aloe emodin	—	—	—	—	—
			—	—	—	—	—
Алоэ древовидного листа Candelabra aloe leaf	Определение основных групп биологически активных веществ Determination of major classes of bioactive compounds	ТСХ: СО — алоэ-эмодин; качественная реакция TLC using aloe emodin RS; identification test	—	—	—	—	—
	Количественное определение Assay	СФ: сумма антраценпроизводных в пересчете на алоэ-эмодин Spectrophotometry: total anthracene derivatives, expressed as aloe emodin	—	—	—	—	—

Примечание. СФ — спектрофотометрия; ТСХ — тонкослойная хроматография; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; СО — стандартный образец; ФС — фармакопейная статья; ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд.; ГФ РБ — Государственная фармакопея Республики Беларусь; «—» — данные отсутствуют.
 Note. TLC—thin layer chromatography; RS—reference standard; HPLC—high-performance liquid chromatography; Ph. Rus.—State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14 ed.; Ph. Bel.—State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus; Ph. Eur.—European Pharmacopoeia; USP—United States Pharmacopoeia; JP—Japanese Pharmacopoeia; «—»—no data available.

Таблица 2. Показатели качества фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов растительного происхождения, стандартизуемых по антраценпроизводным соединениям, в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV изд. и проектов фармакопейных статей

Table 2. Test parameters used in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed., and in draft monographs for quality control of herbal preparations and herbal medicinal products containing anthracene derivatives

ФС и проекты ФС на фармацевтиче- ские субстанции растительного происхождения (Draft) mono- graphs on herbal preparations	Показатель качества Test parameter		ФС и проекты ФС на фармацевтиче- ские субстанции растительного происхождения (Draft) mono- graphs on herbal preparations	Показатель качества Test parameter		Проекты ФС на лекарственные препараты рас- тельного прои- схождения Draft monographs on herbal medici- nal products	Показатель качества Test parameter	
	Определение основных групп биологически ак- тивных веществ Determination of major classes of bioactive com- pounds	Количественное определение Assay		Определение основных групп биологически ак- тивных веществ Determination of major classes of bioactive com- pounds	Количественное определение Assay		Определение основных групп биологически ак- тивных веществ Determination of major classes of bioactive com- pounds	Количественное определение Assay
ФС.2.5.0021.18 Крушины ольхо- видной кора FS.2.5.0021.18 Frangula bark	ТСХ: СО — бар- балонин; каче- ственная реакция TLC using barb- aloin RS (aloin); identification test	СФ: сумма антрагликозидов в пересчете на глюкофрангулин А Spectropho- tometry: total anthraglycosides, expressed as glu- cofrangulin A	ФС.2.4.0005.18 Крушины оль- ховидной коры экстракт сухой FS.2.4.0005.18 Frangula bark dry extract	ТСХ: СО — эмо- дин; качествен- ные реакции TLC using emodin RS, identification tests	СФ: сумма антра- ценпроизводных в пересчете на франгулаэмодин Spectropho- tometry: total anthracene deriva- tives, expressed as frangula emodin	Проект ФС «Крушины оль- ховидной коры экстракт сухой, таблетки» Draft monograph on Frangula bark dry extract, tablets	ТСХ: СО — эмо- дин; качествен- ные реакции TLC using emodin RS, identification tests	СФ: сумма антра- ценпроизводных в пересчете на франгулаэмодин Spectropho- tometry: total anthracene deriva- tives, expressed as frangula emodin
ФС.2.5.0083.18 Марены корневи- ща и корни FS.2.5.0083.18 Madder rhizome and root	ТСХ: качествен- ная реакция TLC; identifica- tion test	СФ: связанные производные антрацена Spectrophotome- try: bound anthra- cene derivatives	Проект ФС «Ма- рены корневищ и корней экстракт сухой» Draft monograph on Madder rhi- zome and root dry extract	ТСХ: качествен- ная реакция TLC; identifica- tion test	СФ: сумма антрагликозидов в пересчете на руберитриновую кислоту Spectropho- tometry: total anthraglycosides, expressed as ru- beritrinic acid	Проект ФС «Ма- рены корневищ и корней экстракт сухой, таблетки» Draft monograph on Madder rhi- zome and root dry extract, tablets	ТСХ: качествен- ная реакция TLC; identifica- tion test	СФ: сумма антрагликозидов в пересчете на руберитриновую кислоту Spectropho- tometry: total anthraglycosides, expressed as ru- beritrinic acid
ФС.2.5.0038.15 Сенны листья FS.2.5.0038.15 Senna leaf	ТСХ: СО — сеннозид Б и барбалонин; каче- ственная реакция TLC using sennoside B RS and barbaloin RS; identification test	СФ: сумма агликонов антра- ценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту Spectrophotome- try: total anthra- cene aglycones, expressed as chrysophanic acid	Проект ФС «Сенны листьев экстракт сухой» Draft monograph on Senna leaf dry extract	ТСХ: СО — сеннозид Б; Качественная реакция TLC using sennoside B RS; identification test	СФ: сумма агликонов антра- ценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту Spectrophotome- try: total anthra- cene aglycones, expressed as chrysophanic acid	Проект ФС «Сенны листьев экстракт сухой, таблетки» Draft monograph on Senna leaf dry extract, tablets	ТСХ: СО — сеннозид Б; качественная реакция TLC using sennoside B RS; identification test	СФ: сумма агликонов антра- ценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту Spectrophotome- try: total anthra- cene aglycones, expressed as chrysophanic acid

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

Проекты ФС и фармацевтические субстанции растительного происхождения (Draft) monographs on herbal preparations	Показатель качества Test parameter		Показатель качества Test parameter		Проекты ФС на лекарственные препараты растительного происхождения (Draft) monographs on herbal medicinal products	Показатель качества Test parameter	
	Определение основных групп биологически активных веществ Determination of major classes of bioactive compounds	Количественное определение Assay	Определение основных групп биологически активных веществ Determination of major classes of bioactive compounds	Количественное определение Assay		Определение основных групп биологически активных веществ Determination of major classes of bioactive compounds	Количественное определение Assay
ФС.2.5.0038.15 Сенны листья FS.2.5.0038.15 Senna leaf	ТСХ: СО — сеннозид Б и барбалоин; качественная реакция TLC using sennoside B RS and barbaloin RS; identification test	СФ: сумма агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту Spectrophotometry: total anthracene aglycones, expressed as chrysophanic acid	ТСХ: СО — сеннозид Б; качественная реакция TLC using sennoside B RS; identification test	СФ: сумма антраценпроизводных соединений в пересчете на сеннозид Б Spectrophotometry: total anthracene derivatives, expressed as sennoside B	Проект ФС «Сенны остролистной листьев экстракт сухой, таблетки» Draft monograph on Alexandrian senna leaf dry extract, tablets	ТСХ: СО — сеннозид Б; качественная реакция TLC using sennoside B RS; identification test	СФ: сумма антраценпроизводных соединений в пересчете на сеннозид Б Spectrophotometry: total anthracene derivatives, expressed as sennoside B
			ТСХ: СО — сеннозид А и Б; качественная реакция TLC using sennosides A and B RSs; identification test	Флуориметрия: содержание кальциевых солей сеннозидов А и Б Fluorometric method: content of sennosides A and B calcium salts	Проект ФС «Сеннозидов А и Б кальциевые соли, таблетки» Draft monograph on Sennosides A and B calcium salts, pastilles	Флуориметрия: СО — сеннозиды А и Б Fluorimetric method using sennosides A and B RSs	Флуориметрия: содержание кальциевых солей сеннозидов А и Б Fluorometric method: content of sennosides A and B calcium salts
					Проект ФС «Сеннозидов А и Б кальциевые соли, таблетки» Draft monograph on Sennosides A and B calcium salts, tablets	Флуориметрия: СО — сеннозиды А и Б; ТСХ: СО — сеннозид А и Б; качественная реакция Fluorimetric method using sennosides A and B RSs TLC using sennosides A and B RSs; identification test	Флуориметрия: содержание кальциевых солей сеннозидов А и Б Fluorometric method: content of sennosides A and B calcium salts

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

ФС и проекты ФС на фармацевтиче- ские субстанции растительного происхождения (Draft) mono- graphs on herbal preparations	Показатель качества Test parameter		ФС и проекты ФС на фармацевтиче- ские субстанции растительного происхождения (Draft) mono- graphs on herbal preparations	Показатель качества Test parameter		Проекты ФС на лекарственные препараты рас- тительного прои- схождения Draft monographs on herbal medici- nal products	Показатель качества Test parameter	
	Определение основных групп биологически ак- тивных веществ Determination of major classes of bioactive com- pounds	Количественное определение Assay		Определение основных групп биологически ак- тивных веществ Determination of major classes of bioactive com- pounds	Количественное определение Assay		Определение основных групп биологически ак- тивных веществ Determination of major classes of bioactive com- pounds	Количественное определение Assay
Проект ФС «Алоэ древовидного по- бегу свежие» Draft monograph on Candelabra aloe fresh sprout	ТСХ: СО — алоэ- эмодин; каче- ственная реакция TLC using aloe emodin RS; iden- tification test	СФ: сумма антра- ценпроизводных в соке в пересчете на алоэ-эмодин Spectropho- tometry: total anthracene deriva- tives in the juice, expressed as aloe emodin	Проект ФС «Алоэ древовидного листьев свежий сок» Draft monograph on Candelabra aloe leaf fresh juice	ТСХ: СО — алоэ- эмодин; каче- ственная реакция TLC using aloe emodin RS; iden- tification test	СФ: сумма антра- ценпроизводных в пересчете на алоэ-эмодин Spectrophotome- try: total anthra- cene derivatives, expressed as aloe emodin	Проект ФС «Алоэ древовидного листьев сок + железа(II) хло- рид, сироп» Draft mono- graph on Can- delabra aloe leaf juice+iron(II) chloride syrup	ТСХ: СО — алоэ- эмодин, каче- ственная реакция TLC using aloe emodin RS; iden- tification test	СФ: сумма антра- ценпроизводных в пересчете на алоэ-эмодин Spectrophotome- try: total anthra- cene derivatives, expressed as aloe emodin
Проект ФС «Алоэ древовидного листья свежие» Draft monograph on Candelabra aloe fresh leaf	ТСХ: СО — алоэ- эмодин; каче- ственная реакция TLC using aloe emodin RS; iden- tification test	СФ: сумма антра- ценпроизводных в соке в пересчете на алоэ-эмодин Spectropho- tometry: total anthracene deriva- tives in the juice, expressed as aloe emodin				Проект ФС «Алоэ древовидного листьев сок, линимент» Draft monograph on Candelabra aloe leaf juice, liniment	ТСХ: СО — алоэ- эмодин, каче- ственная реакция TLC using aloe emodin RS; iden- tification test	СФ: сумма антра- ценпроизводных в пересчете на алоэ-эмодин Spectrophotome- try: total anthra- cene derivatives, expressed as aloe emodin
Проект ФС «Алоэ древовидного листья» Draft monograph on Candelabra aloe leaf	ТСХ: СО — алоэ- эмодин, каче- ственная реакция TLC using aloe emodin RS; iden- tification test	СФ: сумма антра- ценпроизводных в пересчете на алоэ-эмодин Spectrophotome- try: total anthra- cene derivatives, expressed as aloe emodin	Проект ФС «Алоэ древовидного листьев экстракт сухой» Draft monograph on Candelabra aloe leaf dry extract	ТСХ: СО — алоэ- эмодин, каче- ственная реакция TLC using aloe emodin RS; iden- tification test	СФ: сумма антра- ценпроизводных в пересчете на алоэ-эмодин Spectrophotome- try: total anthra- cene derivatives, expressed as aloe emodin	Проект ФС «Алоэ древовидного листьев экстракт жидкий, раствор для подкожного введения» Draft monograph on Candelabra aloe leaf liquid extract, solution for subcutaneous injection	ТСХ: СО — алоэ- эмодин, каче- ственная реакция TLC using aloe emodin RS; iden- tification test	СФ: сумма антра- ценпроизводных в пересчете на алоэ-эмодин Spectrophotome- try: total anthra- cene derivatives, expressed as aloe emodin

Примечание. СФ — спектрофотометрия; ТСХ — тонкослойная хроматография; СО — стандартный образец; ФС — фармакопейная статья.
Note. TLC—thin layer chromatography; RS—reference standard.

качества в соответствие с требованиями ФС на конкретную фармацевтическую субстанцию. Согласно проектам ФС на ФСРП, заготовленное от производящего растения алоэ древовидное, идентификацию и количественное определение проводят по одной и той же группе биологически активных веществ. В качестве СО в ТСХ-методиках предложено использовать алоэ-эмодин, в методиках количественного определения спектрофотометрическим методом используется удельный показатель поглощения продуктов реакции алоэ-эмодина с магния ацетатом.

Лекарственное растительное сырье (ЛРС) служит источником получения лекарственных средств в различных лекарственных формах. Были разработаны проекты ФС на фармацевтические субстанции и лекарственные препараты, получаемые из ФСРП крушины ломкой, марены, сенны и алоэ древовидного. При этом учитывались особенности технологии производства фармацевтических субстанций, дающие возможность выделить целевой продукт — сумму антраценпроизводных. В соответствии с требованиями нормативных документов допустимо определение подлинности и содержания биологически активных веществ в ФСРП и в лекарственных растительных препаратах в пересчете на различные соединения (табл. 2). Например, при идентификации ТСХ-методом крушины ломкой коры и полученных из нее лекарственных растительных препаратов в качестве СО используется барбалоин, а при определении содержания суммы антрагликозидов пересчет ведется на глюкофрангулин А. Подлинность крушины ломкой коры экстракта сухого и таблеток на основе данной субстанции оценивается с СО эмодина, а расчет суммы антраценпроизводных соединений осуществляют в пересчете на франгулаэмодин.

Принцип сквозной стандартизации, позволяющий проводить установление подлинности и количественное определение по одной и той же группе биологически активных веществ в линейке от фармацевтической субстанции до лекарственных препаратов, получаемых на их основе, был выдержан для отечественных лекарственных средств алоэ древовидного.

Однако принцип сквозной стандартизации может быть осуществлен не во всех случаях. Так, например, для лекарственных средств на основе сенны листьев данный принцип применим только в отношении установления подлинности. Если при проведении ТСХ-анализа используют СО сеннозида Б и для ФСРП, и для лекарственных средств, то для количественного определения суммы биологически активных веществ пересчет осуществляют на разные антраценпроизводные соединения — хризофановую кислоту (мономерное соединение)

и сеннозид Б (димерное соединение), что обусловлено особенностями технологии получения экстракта и изменением доминирующего биологически активного вещества в получаемом препарате.

Выбор метода анализа и используемого СО определяется характеристиками выделенных индивидуальных веществ. Так, при стандартизации ФСРП сенны листьев и экстрактов из нее для идентификации и количественного определения используют СО сеннозида Б, тогда как для анализа выделенных из фармацевтической субстанции и очищенных кальциевых солей сеннозидов А и Б стало возможным применение высокочувствительного метода флуориметрии.

ВЫВОДЫ

1. Проведен сравнительный анализ требований разделов «Идентификация», «Определение основных групп биологически активных веществ» и «Количественное определение» статей отечественной и зарубежных фармакопей на фармацевтические субстанции растительного происхождения, содержащие антраценпроизводные соединения, по разделам «Идентификация», «Определение основных групп биологически активных веществ» и «Количественное определение». Показано, что основным методом установления подлинности (идентификации) является метод ТСХ, а количественного определения — спектрофотометрический метод.

2. Принцип сквозной стандартизации прослеживается в отечественных стандартах качества в методиках определения антраценпроизводных соединений в фармацевтических субстанциях и в лекарственных препаратах, полученных на их основе.

3. Сравнительный анализ требований отечественных и международных стандартов качества на лекарственные средства растительного происхождения, содержащие антраценпроизводные соединения, выявил целесообразность разработки общих фармакопейных статей «Методы качественного анализа антраценпроизводных соединений в лекарственных средствах растительного происхождения» и «Методы количественного определения антраценпроизводных соединений в лекарственных средствах растительного происхождения».

Вклад авторов. *О. В. Евдокимова* — существенный вклад в концепцию работы, постановка задач исследования, сбор и обобщение данных литературы; *А. В. Бекетова* — написание текста статьи, работа с табличным материалом; *М. Н. Лякина* — редактирование и переработка рукописи, согласование окончательной версии статьи.

Authors' contributions. *Olga V. Evdokimova*—participation in the elaboration of the study concept, formulation of the study objectives, collection and review of scientific literature; *Anastasia V. Beketova*—drafting the paper, preparation of the tables; *Marina N. Lyakina*—editing and revision of the paper, approval of the final version of the paper.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Cen-

tre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

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

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Йорданов Д, Николов П, Бойчинов А. *Фитотерапия*. София: Медицина и физкультура; 1969. [Yordanov D, Nikolov P, Boychinov A. *Phytotherapy*. Sofia: Meditsina i fizkultura; 1969 (In Russ.)]
2. Шмыгарева АА, Куркин ВА, Саньков АН. Сравнительное исследование слабительного действия препаратов, содержащих антрагликозиды. *Медицинский альманах*. 2015;(3):220–2. [Shmygareva AA, Kurkin VA, San'kov AN. Comparative study of laxative effect of medicines containing anthraglycosides. *Meditsinskiy almanakh = Medical Almanac*. 2015;(3):220–2 (In Russ.)]
3. Куркин ВА, Петрухина ИК. Актуальные аспекты создания импортозамещающих лекарственных растительных препаратов. *Фундаментальные исследования*. 2014;(11–2):366–71. [Kurkin VA, Petrukhina IK. The actual aspects of the creation of domestic phytopharmaceuticals. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*. 2014;(11–2):366–71 (In Russ.)]
4. Вичканова СА, Колхир ВК, Сокольская ТА, Воскобойникова ИВ, Быков ВА. Лекарственные средства из растений (опыт ВИЛАР). М.: АДРИС; 2009. [Vichkanova SA, Kolkhir VK, Sokolskaya TA, Voskoboynikova IV, Bykov VA. Herbal medicinal products (experience of VILAR). Moscow: ADRIS; 2009 (In Russ.)]
5. Рыбалко МВ, Шмыгарева АА. Сравнительный анализ номенклатуры группы слабительных растительных лекарственных средств, представленных на фармацевтическом рынке Оренбургской области. В кн.: *IX Международная научно-практическая конференция «Научные исследования и разработки в эпоху глобализации»*. Волгоград; 2017. С. 217–23. [Rybalko MV, Shmygareva AA. Comparative analysis of the nomenclature of laxative herbal medicinal products in the pharmaceutical market of the Orenburg Region. In: *IX International Research and Practice Conference "Research and Development in the Era of Globalisation"*. Volgograd; 2017. P. 217–23 (In Russ.)]
6. Высочина ГИ. Антрахиноны и биологическая активность видов рода *Rheum* L. (Polygonaceae) (Обзор). *Химия растительного сырья*. 2018;(4):29–41. [Vysochina GI. Anthraquinones and biological activity of species of the genus *Rheum* L. (Polygonaceae) (Review). *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of Plant Raw Material*. 2018;(4):29–41 (In Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcrpm.2018043785>
7. Георгиевский ВП, Комиссаренко НФ, Дмитрук СЕ. *Биологически активные вещества лекарственных растений*. Новосибирск: Наука; 1990. [Georgievsky VP, Komissarenko NF, Dmitruk SE. *Biologically active substances of medicinal plants*. Novosibirsk: Nauka; 1990 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Евдокимова Ольга Владимировна, д-р фарм. наук, доцент. *Olga V. Evdokimova*, Dr. Sci. (Pharm.), Associate Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-2191-1033>

Бекетова Анастасия Викторовна, канд. фарм. наук. *Anastasia V. Beketova*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-6975-516X>

Лякина Марина Николаевна, д-р фарм. наук, старший научный сотрудник. *Marina N. Lyakina*, Dr. Sci. (Pharm.), Senior Research Associate. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8220-1054>

Статья поступила 07.12.2020

После доработки 23.04.2021

Принята к печати 31.05.2021

Article was received 7 December 2020

Revised 23 April 2021

Accepted for publication 31 May 2021

АКТУАЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

В настоящее время в фармацевтическом сообществе обсуждается вопрос создания единого регуляторного органа в сфере обращения лекарственных средств на территории ЕАЭС. По информации из Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) членами рабочей группы по формированию общих подходов к регулированию обращения лекарственных средств в государствах — членах ЕАЭС подготовлены необходимые предложения по дальнейшей работе. Предложения будут обсуждаться всеми государствами ЕАЭС до выработки согласованной позиции по этому вопросу. Решение по созданию единого регуляторного органа ЕАЭС принимается на уровне глав государств объединения и потребует изменений в Договор о Союзе от 29 мая 2014 года.

Потребность в едином регуляторном органе отмечали и на недавнем Российском фармацевтическом форуме в Санкт-Петербурге. Решение данного вопроса может завершиться к 2023–2024 г. Единый регуляторный орган в ЕАЭС мог бы стать аналогом Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA).

Публикуется по «Известия (iz)» от 20 мая 2021 г.

<https://iz.ru/1166280/ekaterina-iasakova/farm-faktor-v-eaes-mozhet-poiavitsia-svoe-meditsinskoe-agentstvo>

Определение пирогенных примесей в гормональных имплантатах с помощью ЛАЛ-теста

Н. П. Неугодова, О. В. Шаповалова*, Г. А. Сапожникова, Е. О. Степанюк

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

Резюме. Согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд. имплантаты являются стерильной лекарственной формой, для которой обязательным является контроль пирогенности. Однако особенности выполнения анализа для данной лекарственной формы в отечественной фармакопее не описаны. **Цель работы:** разработать методику определения содержания бактериальных эндотоксинов (БЭ) с помощью ЛАЛ-теста в имплантатах на примере гормонального препарата с активным веществом гозерелин. **Материалы и методы:** выполняли процесс экстракции БЭ с поверхности имплантата в водную среду и определяли содержание БЭ в смыве турбидиметрическим кинетическим методом. Затем имплантат растворяли в диметилсульфоксиде и оценивали наличие БЭ в полученном растворе гозерелина с помощью гель-тромб теста. **Результаты:** на основании существующих в отечественной и зарубежной фармакопейной практике подходов к определению пирогенных примесей в гормональных имплантатах предложено два способа предварительной подготовки образцов для последующего определения содержания БЭ (в смыве и в растворе имплантата). Установлено, что содержание БЭ в водном смыве не превышает 0,01 ЕЭ/мл и составляет менее 0,07 ЕЭ на имплантат. Содержание БЭ в растворе имплантата составило менее 8,3 ЕЭ на 1 мг гозерелина, что почти в 11 раз меньше теоретически рассчитанной нормы. **Выводы:** разработаны две методики определения БЭ в имплантатах гормональных препаратов с помощью ЛАЛ-теста, пригодные для включения в нормативную документацию. Первая методика предусматривает испытание водного смыва с поверхности имплантата с нормой предельного содержания БЭ «не более 20 ЕЭ/изделие». Вторая методика основана на полном растворении имплантата в диметилсульфоксиде с нормой «не более 97,22 ЕЭ на 1 мг гозерелина».

Ключевые слова: ЛАЛ-тест; бактериальные эндотоксины; пирогены; имплантаты; гормональные препараты

Для цитирования: Неугодова НП, Шаповалова ОВ, Сапожникова ГА, Степанюк ЕО. Определение пирогенных примесей в гормональных имплантатах с помощью ЛАЛ-теста. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(2):115–120. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-115-120>

* **Контактное лицо:** Шаповалова Ольга Владимировна; shapovalova@expmed.ru

Detection of Pyrogens in Hormonal Implants Using the LAL Test

N. P. Neugodova, O. V. Shapovalova*, G. A. Sapozhnikova, E. O. Stepanyuk

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

Abstract. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th edition states that implants are a sterile dosage form, and have to be tested for pyrogens. However, it does not provide details on how the test should be performed for this dosage form. **The aim of the study** was to develop a LAL test procedure for detection of bacterial endotoxins (BE) in implants, using the example of a goserelin product. **Materials and methods:** BE extraction from the implant surface into an aqueous medium was performed with subsequent BE detection in the extract by turbidimetric kinetic test. The implant was then dissolved in dimethyl sulfoxide, and the obtained goserelin solution was tested for BEs using the gel-clot test. **Results:** the analysis of the Russian and foreign pharmacopoeial approaches to pyrogenic substance detection in hormonal implants helped to develop two sample preparation procedures for determination of BE content (in the extract and the implant solution). It was demonstrated that the BE content in the water extract did not exceed 0.01 EU/mL and was less than 0.07 EU per implant. The BE content in the implant solution was less than 8.3 EU per 1 mg of goserelin, which is almost eleven-fold lower than the theoretically-derived limit. **Conclusions:** the authors developed two test procedures for BE detection in hormonal implants using the LAL test, which could be included in manufacturers' product files. The first procedure involves testing of the water extract from the implant surface and establishes the BE limit of no more than 20 EU/product. The second procedure involves complete dissolution of the implant in dimethyl sulfoxide and establishes the limit of not more than 97.22 EU per 1 mg of goserelin.

Key words: LAL test; bacterial endotoxins; pyrogens; implants; hormone products

For citation: Neugodova NP, Shapovalova OV, Sapozhnikova GA, Stepanyuk EO. Detection of pyrogens in hormonal implants using the LAL test. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(2):115–120. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-115-120>

* **Corresponding author:** Olga V. Shapovalova; shapovalova@expmed.ru

Препараты для парентерального применения представляют собой стерильные лекарственные формы, предназначенные для введения в организм человека путем инъекций, инфузий или имплантации (с нарушением целостности кожных покровов или слизистых оболочек, минуя желудочно-кишечный тракт). В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) лекарственные формы для парентерального применения¹ и фармацевтические субстанции², используемые для их приготовления, подвергают испытанию на бактериальные эндотоксины (БЭ) или пирогены. Испытания проводят в соответствии с требованиями общих фармакопейных статей (ОФС) «Бактериальные эндотоксины»³ или «Пирогенность»⁴. Пирогенные примеси могут вызывать у человека лихорадку, шок и даже смерть. Следовательно, необходимо обнаруживать и/или количественно определять БЭ в лекарственных формах для парентерального применения. К таким формам относятся и имплантаты⁵ [1].

В настоящее время гормональные имплантаты активно применяются в гинекологии и офтальмологии: это препараты, содержащие эстрогены, дексаметазон и другие активные вещества, высвобождающиеся в течение длительного времени [2–6]. Определение пирогенных примесей в имплантатах возможно с помощью трех методов: испытание на пирогенность, тест активации моноцитов, определение БЭ с помощью лизата амебцитов клеток крови мекхвоста (ЛАЛ-тест). У каждого метода есть свои преимущества и недостатки [7, 8]. При определении пирогенности с использованием лабораторных животных испытуемый образец имплантируют в тело кролика и наблюдают за изменением температуры, указывающей на пирогенную реакцию. К несовершенству метода можно отнести несколько факторов: 1) более низкая чувствительность животных к пирогенам по сравнению с человеком; 2) ложноположительные пирогенные реакции как следствие воспалительного процесса в результате разрушения тканей при имплантации гормонального препарата в тело животного; 3) возможность применения только для имплантатов небольшого размера [7].

В соответствии с общемировыми тенденциями по сокращению использования лабораторных животных в Европе проводятся исследования с использованием теста активации моноцитов (monocyte

activation test, МАТ) для обнаружения пирогенных примесей в медицинских изделиях [9]. Для оценки пирогенного загрязнения имплантируемых медицинских устройств применяли методику *in vitro*: образец инкубировали со свежей или криоконсервированной цельной кровью человека и определяли наличие провоспалительного цитокина (интерлейкин-1 β) с помощью иммуноферментного анализа. Исследовали возможность применения МАТ для проверки нейрохирургических имплантатов, а именно зажимов аневризмы. Благодаря непосредственному контакту исследуемого материала с клетками крови в этом тесте не нужно оценивать смыв с поверхности образца, при выполнении которого возможно получение неоднозначных результатов [10–12]. Непосредственное определение пирогенов — это одно из важных преимуществ МАТ перед методикой определения с помощью ЛАЛ-теста. Препятствием использования МАТ в рутинных анализах является трудоемкая и длительная по времени работа с цельной кровью для создания пула от различных доноров, пригодного для теста, или с моноцитами, выделенными из периферической крови, дороговизна реактивов и необходимость наличия специальных условий для проведения испытания [9].

При выполнении ЛАЛ-теста возможны два варианта анализа. В первом случае имплантат следует оценивать согласно требованиям статьи Фармакопеи США 42 изд. (USP 42)⁶, где указано, что содержание БЭ определяют в водных смывах с изделий медицинского назначения, в том числе и с имплантатов. Расчет допустимой концентрации БЭ в смыве выполняется с учетом установленной нормы БЭ (не более 20 ЕЭ/изделие)⁷, количества изделий и объема воды для приготовления смыва. Для подготовки смывов предлагается использовать воду для ЛАЛ-теста, подогретую до 37 °С. Время экстракции составляет 1 ч. Перемешивание достаточно проводить в начале и в конце экстрагирования⁸. Предельное содержание БЭ в исходном растворе смыва рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{K \times N}{V}, \quad (1)$$

где C — концентрация БЭ в смыве, ЕЭ/мл;

K — допустимое содержание БЭ в расчете на одно изделие, ЕЭ/изделие;

N — количество изделий, шт.;

V — объем воды для приготовления смыва, мл.

¹ ОФС.1.4.1.0007.15 Лекарственные формы для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. М.; 2018.

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

³ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. М.; 2018.

⁴ ОФС.1.2.4.0005.15 Пирогенность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. М.; 2018.

⁵ ОФС.1.4.1.0026.18 Имплантаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. М.; 2018.

⁶ Monograph (161) Medical devices — bacterial endotoxin and pyrogen tests. United States Pharmacopeia. 42nd ed. Rockville, MD; 2019.

⁷ Guidance for industry. Pyrogen and endotoxins testing: Questions and answers. U.S. Department of Health and Human Services; 2012.

⁸ ЛАЛ-тест. Периодический бюллетень для специалистов, работающих в области фармации, медицины и биологии. 2019;1(25):2–5.



Рис. 1. Объект исследования
Fig. 1. Test object

Другой способ определения БЭ предусматривает полное растворение имплантата и дальнейшее испытание полученного раствора согласно требованиям ГФ РФ⁹. Для этого испытуемые образцы растворяют в органических растворителях, исходные растворы разбавляют водой для ЛАЛ-теста до концентрации, при которой не обнаруживаются мешающие факторы растворителя. Установлено, что растворы этанола (5%) и диметилсульфоксида (2%) не обладают мешающими факторами в ЛАЛ-тесте [13].

Цель работы — разработать методику определения содержания бактериальных эндотоксинов с помощью ЛАЛ-теста в имплантатах на примере гормонального препарата с активным веществом гозерелин.

Для достижения цели необходимо было установить и апробировать подходы к определению БЭ в исследуемом объекте, предложить методику предварительной подготовки образцов для последующего определения содержания БЭ с помощью гел-тестов и турбидиметрического кинетического метода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся гормональный препарат пролонгированного действия, содержащий 3,6 мг гозерелина (рис. 1). Имплантат из полимерного материала в виде гибкого стержня длиной 12 мм цилиндрической формы белого цвета заключен в иглу одноразового шприца. Вспомогательные вещества в составе имплантата: сополимеры DL-молочной и гликолевой кислот.

Все используемые реактивы и материалы соответствовали требованиям ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины»¹⁰, не содержали определяемое количество БЭ и не оказывали влияния на результаты испытаний. Качество использованных



Рис. 2. Процедура экстракции бактериальных эндотоксинов с поверхности имплантата в водную среду

Fig. 2. Procedure for bacterial endotoxin extraction from the implant surface into an aqueous medium

реактивов и расходных материалов подтверждено сертификатами.

В первом случае для приготовления смыва три стержня помещали в апиrogenный флакон и добавляли 20 мл воды для ЛАЛ-теста (рис. 2). Процедуру экстракции выполняли в течение 1 ч на водяной бане при температуре 37 °С. Перемешивание проводили в начале и конце экстрагирования. По окончании процедуры экстракции имплантаты извлекали, смыв использовали в качестве испытуемого раствора. Рассчитывали предельную концентрацию БЭ в смыве по формуле (1):

$$C = \frac{20 \text{ ЕЭ/изд.} \times 3 \text{ изд.}}{20 \text{ мл}} = 3,0 \text{ ЕЭ/мл.}$$

Определяли БЭ в смыве с помощью набора реактивов для турбидиметрического кинетического теста (Charles River Endosafe), измерение степени мутности реакционной смеси проводили на автоматическом фотометре для микропланшетов (BioTek ELx808IU) со специальным программным обеспечением (Endoscan-V). Для построения калибровочной кривой готовили растворы контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ) с концентрациями 5; 1; 0,2; 0,05 и 0,01 ЕЭ/мл. Положительный контроль смыва с концентрацией эндотоксина 0,5 ЕЭ/мл готовили, используя раствор КСЭ с концентрацией 5 ЕЭ/мл. Испытуемый раствор (смыв) перед определением БЭ дополнительно не разбавляли.

Во втором случае определение БЭ в растворе гозерелина выполняли в соответствии со схемой, представленной на рисунке 3. Для этого имплантат помещали в апиrogenный флакон с 10 мл диметилсульфоксида 99,5% (Sigma-Aldrich, кат. № D4540) и интенсивно перемешивали в течение 7–10 мин на вихревой мешалке до полного растворения стержня. Норму предельного содержания БЭ рассчитывали в соответствии с ОФС «Бактериальные

⁹ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. М.; 2018.

¹⁰ Там же.

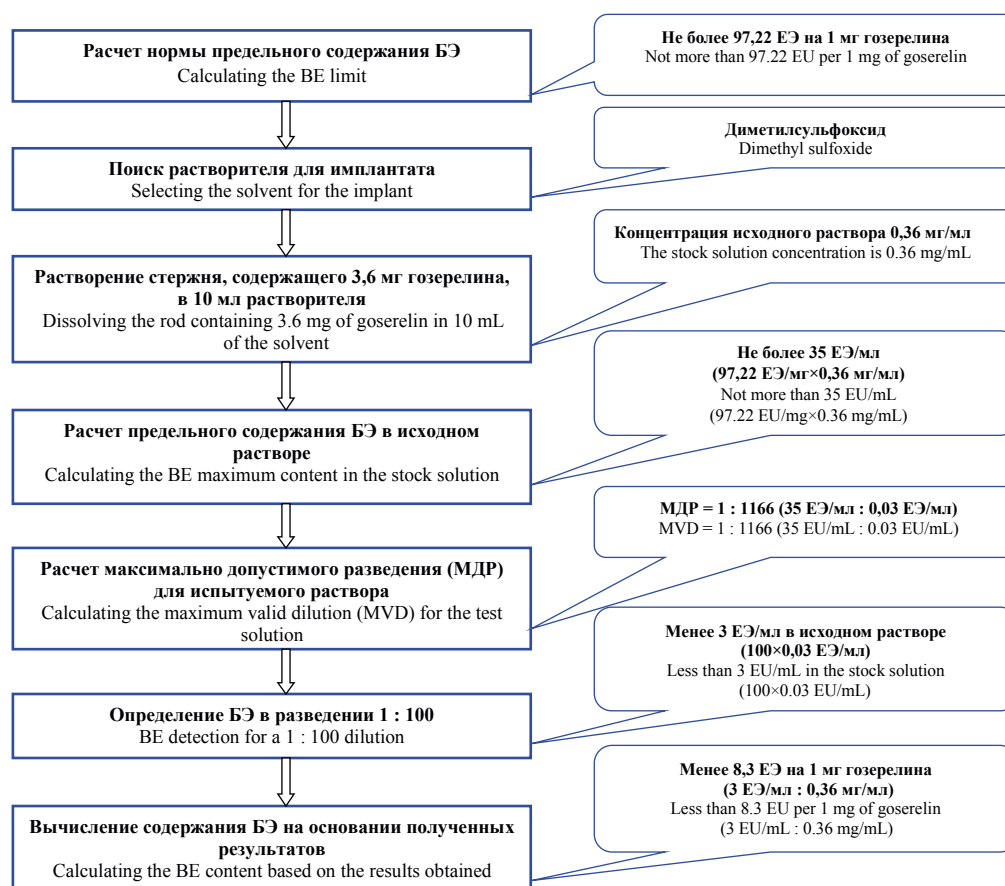


Рис. 3. Схема определения бактериальных эндотоксинов (БЭ) в растворенном имплантате с результатами исследований
Fig. 3. Flow chart for bacterial endotoxin (BE) detection in the dissolved implant, and the results of the study

эндотоксины»¹¹ и указаниями инструкции по медицинскому применению. Из исходного раствора с концентрацией гозерелина 0,36 мг/мл готовили испытуемый раствор в воде для ЛАЛ-теста (разведение 1 : 100). Содержание БЭ в испытуемом растворе оценивали с помощью реактивов для выполнения гель-тромб теста (Associates of Cape Cod, Inc.). Чувствительность используемого лизата амебоцитов (ЛАЛ-реактива) составляла 0,03 ЕЭ/мл (λ). Для проведения предварительного анализа «Мешающие факторы» готовили разведения КСЭ с концентрациями 2λ (0,06 ЕЭ/мл), λ (0,03 ЕЭ/мл), 0,5λ (0,015 ЕЭ/мл), 0,25λ (0,0075 ЕЭ/мл) как на воде для ЛАЛ-теста, так и на растворах имплантата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первом случае наличие БЭ оценивали в водном смыве имплантатов. Данная методика предусматривала испытание с учетом нормы «не более 20 ЕЭ/изделие»¹². Концентрацию БЭ в смыве определяли с помощью турбидиметрического кинетического теста как наиболее чувствительного метода. Результат составил «менее 0,01 ЕЭ/мл» или «менее 0,07 ЕЭ/изделие», что значительно ниже

установленной нормы предельного содержания БЭ. Значения коэффициента корреляции свидетельствовали о линейности полученных результатов. Содержание БЭ в положительном контроле смыва составило 75% от установленного значения и соответствовало критериям приемлемости, то есть находилось в диапазоне от 50 до 200% (табл. 1).

Второй вариант методики исследования основан на полном растворении имплантата и определении БЭ в полученном растворе препарата с известной концентрацией гозерелина. В качестве растворителя для имплантата использовали диметилсульфоксид. Возможность применения данного органического растворителя в ЛАЛ-тесте была подтверждена ранее [14]. С учетом пороговой пирогенной дозы, безопасной для человека при парентеральном введении (не более 350 ЕЭ), содержание БЭ в имплантате гозерелина при однократном подкожном введении не должно превышать 350 ЕЭ на 1 имплантат. В пересчете на активное вещество норма БЭ составила «не более 97,22 ЕЭ на 1 мг гозерелина».

Для подтверждения соответствия качества исследуемого имплантата по показателю

¹¹ Там же.

¹² Monograph (161) Medical devices — bacterial endotoxin and pyrogen tests. United States Pharmacopeia. 42nd ed. Rockville, MD; 2019.

Таблица 1. Учет результатов испытаний смыва турбидиметрическим кинетическим тестом
Table 1. Results of testing the extract by kinetic-turbidimetric method

Валидационный показатель Validation parameter	Критерии приемлемости Acceptance criteria	Результаты Results
Линейность Linearity	Коэффициент корреляции от –1,000 до –0,980 Correlation coefficient: from –1.000 to –0.980	–0,9992
	Наклон: от –0,400 до –0,100 Slope: from –0.400 to –0.100	–0,2762
	Отрезок, отсекаемый на оси Y: 2,500–3,500 Y-intercept: 2.500–3.500	2,8439
Отрицательный контроль (вода для ЛАЛ-теста) Negative control (LAL reagent water)	Менее концентрации эндотоксина, определяемой используемым методом Less than the endotoxin concentration determined by the test method used	<0,01
Устойчивость Robustness	Степень извлечения бактериальных эндотоксинов в положительном контроле образца: 50–200% Bacterial endotoxin recovery in the positive product control: 50–200%	75%

Таблица 2. Валидация установленного разведения раствора гозерелина с концентрацией 0,36 мг/мл
Table 2. Validation of the established dilution of the 0.36 mg/mL goserelin solution

Повторность № Replicate	Разведения контрольного стандарта эндотоксина Dilutions of the control standard endotoxin				Концентрация эндо- токсина в конечной точке реакции, ЕЭ/мл Endotoxin concentra- tion at the reaction endpoint, EU/mL	Среднее геометрическое значение концентрации эндотоксина, ЕЭ/мл Geometric mean en- dotoxin concentration, EU/mL	Отрицательный контроль (вода для ЛАЛ-теста) Negative control (LAL reagent water)	Испытуемый раствор Test solution
	2λ	λ	0,5λ	0,25λ				
	в воде для ЛАЛ-теста in LAL reagent water							
1	+	+	—	—	0,03	0,03		
2	+	+	—	—	0,03			
	в испытуемом растворе имплантата in the implant test solution							
1	+	+	—	—	0,03	0,04		
2	+	+	—	—	0,03			
3	+	—	—	—	0,06			
4	+	—	—	—	0,06			

Примечание. «+» — наличие геля, «–» — отсутствие геля.
Note. “+” —with gel, “–” —without gel.

«Бактериальные эндотоксины» было проведено исследование, демонстрирующее возможность выполнения анализа с помощью гель-тромб теста. Оценивали испытуемый раствор в разведении водой для ЛАЛ-теста 1 : 100, данное разведение в 11 раз меньше величины максимально допустимого разведения. Содержание БЭ в исследуемом образце составило менее 8,3 ЕЭ/мг гозерелина. При проведении предварительного анализа «Мешающие факторы» выполнена валидация установленного разведения раствора гозерелина с концентрацией 0,36 мг/мл (табл. 2). Чувствительность ЛАЛ-реактива, определенная с использованием разведений КСЭ в воде для ЛАЛ-теста, во всех опытах практически не отличалась от чувствительности ЛАЛ-реактива, определенной в серии разведений КСЭ в растворах имплантата. Это означает, что разведение 1 : 100 исходного раствора имплантата не ингибирует и не потенцирует реакцию гелеобразования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложено два различных подхода к определению пирогенных примесей в имплантатах, в соответствии с которыми разработаны методики оценки качества гормонального имплантата с активным веществом гозерелин по показателю «Бактериальные эндотоксины».

1. Для определения БЭ в смыве с поверхности препарата пробоподготовку рекомендуется проводить при температуре 37 °С в воде для ЛАЛ-теста в течение 1 ч. В соответствии с международными требованиями норма предельного содержания БЭ для смыва с поверхности имплантата должна составлять «не более 20 ЕЭ на изделие» и рассчитываться с учетом количества анализируемых имплантатов и объема воды для ЛАЛ-теста.

2. Для оценки содержания БЭ в пересчете на количество активного вещества в препарате предложено растворять имплантат в диметилсульфоксиде

и проводить определение БЭ в полученном растворе. Выбрано разведение исходного раствора имплантата, в котором не обнаруживается мешающее влияние растворителя на реакцию гелеобразования ЛАЛ-реактива с эндотоксином. Исходный раствор имплантата в диметилсульфоксиде следует разбавлять водой для ЛАЛ-теста не менее чем в 100 раз перед определением содержания БЭ.

Обе разработанные методики могут быть рекомендованы к внесению в нормативную документацию на гормональные имплантаты, так как позволяют определять БЭ в количествах, гарантирующих безопасное применение препарата.

Вклад авторов. Н. П. Неугодова — обоснование концепции исследования, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; О. В. Шаповалова — планирование исследования, проведение сравнительного анализа, оформление и редактирование текста; Г. А. Сапожникова — получение первичных данных, их анализ и систематизация; Е. О. Степанюк — сбор данных литературы, написание текста.

Authors' contributions. Natalia P. Neugodova—substantiation of the study concept, approval of the final version of the paper for publication; Olga V. Shapovalova—planning of the study, performing comparative analysis, formatting and editing of the text; Galina A. Sapozhnikova—obtaining primary data, analysis and systematisation of the obtained data; Ekaterina O. Stepanyuk—literature review, writing of the text.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

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

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ouédraogo M, Semdé R, Somé TI, Ouédraogo M, Ouédraogo R, Henschel V, et al. Development of an *in vitro* endotoxin test for monolein–water liquid crystalline gel for use as an implant. *Trop J Pharm Res.* 2009;8(6):501–8.
- Сунь В, Чжан С, Ван Т, Лэн Г, Сунь К, Ли Ю, Ли В. Фармацевтические композиции микросфер гозерелина с пролонгированным высвобождением. Патент Российской Федерации № 2694901С2; 2014. [Sun V, Chzhan S, Van T, Sun K, Li Yu, Liu V. Pharmaceutical compositions of Goserelin microspheres with prolonged release. Patent of the Russian Federation No. 2694901С2; 2014 (In Russ.)]
- Бикбов ММ, Файзрахманов РР, Арслангареева ИИ, Салаватова ВФ, Павловский ОА. Особенности действия импланта с дексаметазоном при окклюзии вен сетчатки. *Офтальмохирургия.* 2018;(2):46–50. [Bikbov MM, Fayzrahmanov RR, Arslangareeva II, Salavatova VF, Pavlovsky OA. Action features of the implant with dexamethasone on indicators of retinal vein occlusions. *Oftal'mokhirurgiya = Ophthalmic Surgery.* 2018;(2):46–50 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.25276/0235-4160-2018-2-46-50>
- Пустотина ОА. Чистогестагенная имплантационная контрацепция (обзор международных клинических рекомендаций). *Медицинский Совет.* 2015;(XX):5–6. [Pustotina OA. Progestin-only implant contraception (a review of global clinical guidelines). *Meditinskii sovet = Medical Council.* 2015;(XX):5–6 (In Russ.)]
- Stewart SA, Domínguez-Robles J, Donnelly R, Larrañeta E. Implantable polymeric drug delivery devices: Classification, manufacture, materials, and clinical applications. *Polymers (Basel).* 2018;10(12):1379. <https://doi.org/10.3390/polym10121379>
- Rajgor N, Bhaskar V, Patel M. Implantable drug delivery systems: An overview. *Syst Rev Pharm.* 2011;2(2):91–5.
- Mazzotti F, Beuttler J, Zeller R, Fink U, Schindler S, Wendel A, et al. *In vitro* pyrogen test — a new test method for solid medical devices. *J Biomed Mater Res A.* 2007;80(2):276–82. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30922>
- Wallin RF. A practical guide to ISO 10993-11: Systemic Effects. Medical Device and Diagnostic Industry Magazine, July 1998. <https://www.mddionline.com/news/practical-guide-iso-10993-11-systemic-effects>
- Allen D, Clippinger A, Morefield S, Casey W, Ghosh C, Goode J, Brown J. Using the Monocyte Activation Test for medical devices. NICEATM poster: SOT 2019 Annual Meeting. <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/meetings/sot19/allen-poster-508.pdf>
- Borton LK, Coleman KP. Material-mediated pyrogens in medical devices: Applicability of the *in vitro* Monocyte Activation Test. *ALTEx.* 2018;35(4):453–63. <https://doi.org/10.14573/altex.1709221>
- Silva C, Oliveira C, Carneiro P, Marengo E, Mattos K, Almeida R, et al. Alternative methods for the detection of pyrogens in products and environment subject to public health surveillance: advances and perspectives in Brazil based on the international recognition of the Monocyte Activation. *Vigil Sanit Debate.* 2018;6(1):137–49. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.01082>
- Stang K, Fennrich S, Krajewski S, Stoppelkamp S, Burgener IA, Wendel HP, Post M. Highly sensitive pyrogen detection on medical devices by the monocyte activation test. *J Mater Sci: Mater Med.* 2014;25(4):1065–75. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-5136-6>
- Williams KL, ed. *Endotoxins. Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation.* 3rd ed. New York: CRC Press; 2007.
- Шаповалова ОВ, Долгова ГВ, Неугодова НП, Сапожникова ГА. Использование органических растворителей для определения показателя «Бактериальные эндотоксины» в фармацевтических субстанциях, не растворимых в воде. *Антибиотики и химиотерапия.* 2013;58(9–10):41–4. [Shapovalova OV, Dolgova GV, Neugodova NP, Sapozhnikova GA. Organic solvents for determination of bacterial endotoxin index in water-insoluble pharmaceutical substances. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy.* 2013;58(9–10):41–4 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Неугодова Наталья Петровна, канд. биол. наук. Natalia P. Neugodova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>
Шаповалова Ольга Владимировна, канд. фарм. наук. Olga V. Shapovalova, Cand. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0305-7769>
Сапожникова Галина Алексеевна. Galina A. Sapozhnikova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0379-5980>
Степанюк Екатерина Олеговна. Ekaterina O. Stepanyuk. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6728-594X>

Статья поступила 22.09.2020

После доработки 24.03.2021

Принята к печати 31.05.2021

Article was received 22 September 2020

Revised 24 March 2021

Accepted for publication 31 May 2021

Количественное определение арбутина в лекарственных растительных препаратах

Н. П. Антонова, С. С. Прохвятилова, Е. П. Шефер, А. М. Калинин*,
И. М. Моргунов, Т. А. Голомазова, У. С. Легонькова

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. Арбутин — основное действующее вещество многих лекарственных растительных препаратов, обладающих диуретическим, антимикробным, бактерицидным и антиоксидантным действием. Часто эти препараты представляют собой сборы, то есть смеси нескольких видов лекарственного растительного сырья. Подходы к стандартизации таких препаратов могут существенно различаться. **Цель работы:** сравнение аналитических методик количественного определения арбутина, используемых для стандартизации арбутинсодержащих лекарственных растительных препаратов. **Материалы и методы:** объектами исследования служили однокомпонентный лекарственный растительный препарат — Толокнянки обыкновенной листья, и многокомпонентный — Бруснивер® (сбор растительный, порошок). Исследования проводились методами титриметрии, спектрофотометрии в УФ- и видимой области спектра и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). **Результаты:** проведена сравнительная оценка пяти методик количественного определения арбутина, включенных в фармакопейные статьи и нормативную документацию на арбутинсодержащие препараты. **Выводы:** установлено, что рассмотренные методики анализа не могут использоваться как взаимозаменяемые, нормы содержания арбутина должны быть установлены в условиях каждой конкретной методики. Йодометрическая методика является наиболее трудоемкой и времязатратной, определение конечной точки титрования является субъективным. Спектрофотометрические методики позволяют проводить испытания без использования стандартного образца арбутина и могут давать завышенные результаты по сравнению с титриметрической и ВЭЖХ-методиками. ВЭЖХ-методики являются более селективными, однако требуют использования стандартных образцов. Для целей контроля качества лекарственных растительных препаратов могут быть рекомендованы методики ВЭЖХ и спектрофотометрии в видимой области; титриметрическая методика рекомендуется к замене. **Ключевые слова:** арбутин; количественное определение; Бруснивер®; толокнянки обыкновенной листья; стандартизация; йодометрия; спектрофотометрия; ВЭЖХ

Для цитирования: Антонова НП, Прохвятилова СС, Шефер ЕП, Калинин АМ, Моргунов ИМ, Голомазова ТА, Легонькова УС. Количественное определение арбутина в лекарственных растительных препаратах. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(2):121–129. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-121-129>
* **Контактное лицо:** Калинин Артем Михайлович; Kalinin@expmed.ru

Determination of Arbutin in Herbal Medicinal Products

N. P. Antonova, S. S. Prokhvatilova, E. P. Shefer, A. M. Kalinin*,
I. M. Morgunov, T. A. Golomazova, U. S. Legon'kova

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

Abstract. Arbutin is the main active ingredient in many herbal medicinal products that have diuretic, antimicrobial, bactericidal, and antioxidant effects. Many of these products are mixtures of different herbal substances. Therefore, the approaches to quality control of HMPs can vary significantly. **The aim of the study** was to compare arbutin assay procedures used in quality control of arbutin-containing products. **Materials and methods:** samples of the following HMPs were used in the study: monocomponent Bearberry Leaf and multicomponent Brusniver® (herbal mixture, powder). The test methods used were titrimetry, ultraviolet-visible spectrophotometry, and high-performance liquid chromatography (HPLC). **Results:** the authors compared five arbutin assay procedures described in the monographs and product files for arbutin-containing HMPs. **Conclusions:** it has been established that the analysed procedures cannot be used interchangeably as equivalent test methods; the limits for arbutin have to be established for each specific procedure. Iodometric titration is the most labour- and time-consuming method, and the determined titration endpoint is a subjective assessment. Spectrophotometric methods do not require the use of an arbutin reference standard, but they can give overestimated results as compared to the HPLC and titrimetry methods. HPLC methods are more selective, but they require the use of reference standards. The recommended test methods for HMP quality control are HPLC and visible spectrophotometry; the titrimetric method is recommended for replacement.

Key words: arbutin; quantitative determination; assay; Brusniver®; bearberry leaf; quality control; iodometric titration; spectrophotometry; HPLC

For citation: Antonova NP, Prokhvatilova SS, Shefer EP, Kalinin AM, Morgunov IM, Golomazova TA, Legon'kova US. Determination of arbutin in herbal medicinal products. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(2):121–129. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-121-129>

* **Corresponding author:** Artem M. Kalinin; Kalinin@expmed.ru

Арбутин — основное действующее вещество многих лекарственных растительных препаратов (ЛРП), обладающих диуретическим, антимикробным, бактерицидным и антиоксидантным действием [1, 2]. Его мочегонное действие обусловлено повышением гломерулярной фильтрации и усилением почечного кровотока, сопровождается повышением экскреции калия и креатинина, но не связано с увеличением экскреции натрия [2]. Арбутин проявляет антибактериальные и бактерицидные свойства благодаря его агликону — гидрохинону, образующемуся в желудочно-кишечном тракте в результате ферментативного гидролиза [3]. Антиоксидантное действие арбутина обусловлено, по всей вероятности, активацией факторов неферментной антиоксидантной защиты [1]. Также арбутинсодержащие растительные экстракты применяются в составе ЛРП для лечения гиперпигментации кожи, поскольку арбутин ингибирует тирозиназу — фермент, катализирующий реакцию синтеза меланина из L-тирозина [4].

Арбутин содержится в лекарственном растительном сырье толокнянки обыкновенной листьев (в сумме с метиларбутином и свободным гидрохиноном — от 8 до 25%), брусники листьев (до 9%) и бадана корневищ (от 9 до 33,3%)¹. Часто арбутинсодержащие ЛРП представляют собой смеси нескольких видов лекарственного растительного сырья — сборы (табл. 1).

Подходы к стандартизации арбутинсодержащих препаратов по основным действующим веществам (показатель «Количественное определение») различаются (табл. 2). Основной проблемой стандартизации таких ЛРП является необходимость работы с многокомпонентными извлечениями из растительного сырья, как правило, без предварительного разделения экстрагируемых из сборов веществ на отдельные составляющие, что затрудняет установление единой нормы содержания действующих веществ. Как следствие, постоянно разрабатываются новые аналитические методики качественного и количественного анализа каждого отдельного ЛРП. Ввиду расширяющегося перечня применяемых аналитических методик встает вопрос об их сравнении.

Цель работы — сравнение аналитических методик количественного определения арбутина, используемых для стандартизации арбутинсодержащих ЛРП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были использованы однокомпонентный ЛРП Толокнянки обыкновенной листья, ООО «Фито-Бот», серия 250517 (срок годности до 05.2022) и многокомпонентный

ЛРП (сбор растительный, порошок) Бруснивер®, АО «Красногорсклексредства», серия 221118 (срок годности до 12.2021).

Для приготовления раствора стандартного образца использовали стандартный образец арбутина, содержание основного вещества в котором составляло 100,0% (Sigma-Aldrich, кат. номер A4256).

Использованное оборудование: спектрофотометр Varian Cary 100; жидкостный хроматограф Agilent 1260 Infinity II; электронные весы Mettler Toledo XPE205DR; баня водяная Julabo TW-12, система очистки воды Milli-Q Integral 5.

Проведено экспериментальное сравнение пяти аналитических методик количественного определения арбутина. Для исследования были выбраны методики, используемые для оценки качества ЛРП по содержанию арбутина, включенные в утвержденные фармакопейные статьи и нормативные документы (табл. 3). Обязательным условием являлась общедоступность нормативных документов на методики оценки, а также оборудования и реактивов, необходимых для исследований, что давало возможность оценки взаимозаменяемости методик и выбора между ними.

Методика 1. Йодометрическое титрование — методика количественного определения арбутина, включенная в Государственную фармакопею СССР XI изд.² Пробоподготовка включает следующие этапы: экстракция водой при нагревании, осаждение сопутствующих соединений свинца(II) ацетатом основным, кислотный гидролиз, добавление цинковой пыли для восстановления хинонов, нейтрализация гидрокарбонатом натрия с контролем pH по лакмусовой бумаге. Количественное содержание арбутина определяют титрованием раствором йода, в качестве индикатора используется крахмал.

Методика 2. Спектрофотометрия в УФ-области, методика включена в Государственную фармакопею Российской Федерации XIV изд.³ Биологически активные вещества экстрагируют 70% спиртом на установке с обратным холодильником на кипящей водяной бане. Для очистки от сопутствующих веществ извлечение пропускают через стеклянную колонку, заполненную алюминия оксидом нейтральным. Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 285 нм. Содержание арбутина рассчитывают с использованием значений оптической плотности стандартного образца (СО) арбутина или удельного показателя поглощения арбутина ($A_{1\text{см}}^{1\%} = 72$).

Методика 3. Спектрофотометрия в видимой области, методика включена в проект ФС «Урологический (мочегонный) сбор»⁴. Экстракцию

¹ Быков ВА, ред. Атлас лекарственных растений России. М.: ВИЛАР; 2006.

² ФС Толокнянки листья. Государственная фармакопея СССР. XI изд. Т. 2. М.: Медицина; 1989.

³ ФС.2.5.0099.18 Толокнянки обыкновенной листья. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

⁴ ФС Урологический (мочегонный сбор). https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attachs/000/040/203/original/%D0%A4%D0%A1_%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B5%D0%BA%D1%82_%D0%A3%D1%80%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9-%D1%81%D0%B1%D0%BE%D1%80.docx?1538038414

Таблица 1. Арбутинсодержащие лекарственные растительные препараты
(по данным Государственного реестра лекарственных средств, <https://grls.rosminzdrav.ru>)
Table 1. Arbutin-containing herbal medicinal products (according to the National Register of Medicinal Products)

Наименование Name	Фармакологическая группа Pharmacological class	Состав Composition
Брусники листья Lingonberry leaves	Диуретики Diuretics	Брусники листья 100% <i>Vitis idaeae folia</i> 100%
Толокнянки обыкновенной листья Bearberry leaf	Диуретики, антисептики и дезинфицирующие средства Diuretics, antiseptics and disinfectants	Толокнянки обыкновенной листья 100% <i>Uvae Ursi folia</i> 100%
Бадана корневища Bergenia rhizome	Диуретики, антисептики и дезинфицирующие средства; противодиарейные средства Diuretics, antiseptics, and disinfectants; antidiarrheals	Бадана корневища 100% <i>Bergeniae rhizomata</i> 100%
Урифлорин® Uriflorin®	Диуретики, антисептики и дезинфицирующие средства Diuretics, antiseptics and disinfectants	Толокнянки обыкновенной листья 100% <i>Uvae Ursi folia</i> 100%
Бруснивер® Brusniver®	Диуретики в комбинации Combination diuretics	Брусники листья 50% <i>Vitis idaeae folia</i> 50% Череды трава 10% <i>Bidentis herba</i> 10% Шиповника плоды 20% <i>Rosae fructus</i> 20% Зверобоя трава 20% <i>Hyperici herba</i> 20%
Бруснивер-Т Brusniver-T	Диуретики в комбинации Combination diuretics	Толокнянки обыкновенной листья 30% <i>Uvae Ursi folia</i> 30% Череды трава 10% <i>Bidentis herba</i> 10% Шиповника плоды 40% <i>Rosae fructus</i> 40% Зверобоя трава 20% <i>Hyperici herba</i> 20%
Мочегонный сбор № 2 Diuretic herbal mixture, composition No. 2	Диуретики в комбинации Combination diuretics	Толокнянки обыкновенной листья 40% <i>Uvae Ursi folia</i> 40% Солодки голой корни 20% <i>Glycyrrhizae radices</i> 20% Можжевельника плоды 40% <i>Juniperi Fructus</i> 40%
Урологический (мочегонный) сбор-ф Urological (diuretic) herbal mixture-f	Диуретики в комбинации Combination diuretics	Толокнянки обыкновенной листья 40% <i>Uvae Ursi folia</i> 40% Ноготков цветки 20% <i>Calendulae flores</i> 20% Фенхеля плоды 20% <i>Foeniculi fructus</i> 20% Элеутерококка корневища и корни 10% <i>Eleutherococci rhizomata et radices</i> 10% Мяты перечной листья 10% <i>Menthae piperitae folia</i> 10%
Фитонефрол® (Урологический сбор) Phytonephrol® (Urological herbal mixture)	Диуретики в комбинации Combination diuretics	Толокнянки обыкновенной листья 40% <i>Uvae Ursi folia</i> 40% Ноготков цветки 20% <i>Calendulae flores</i> 20% Укропа огородного плоды 20% <i>Anethi fructus</i> 20% Элеутерококка корневища и корни 10% <i>Eleutherococci rhizomata et radices</i> 10% Мяты перечной листья 10% <i>Menthae piperitae folia</i> 10%

проводят водой при нагревании. Отстоявшееся водное извлечение переносят в делительную воронку, в которую затем последовательно добавляют раствор аминокантипирина, раствор аммиака и раствор калия феррицианида. Продукты реакции экстрагируют дихлорметаном. Определяют

оптическую плотность полученного раствора при длине волны 455 нм. Содержание арбутина рассчитывают с использованием удельного показателя поглощения продуктов реакции арбутина с аминокантипирином и калия феррицианидом ($A_{1\text{см}}^{1\%} = 648$).

Таблица 2. Стандартизация арбутинсодержащих лекарственных растительных препаратов
Table 2. Quality control of arbutin-containing herbal medicinal products

Наименование Name	Определяемое вещество Analyte	Способ определения Test method	Норма содержания Limits	Нормативный документ Official standard
Брусники листья Lingonberry leaf	Арбутин (сырье для произ- водства лекарственных рас- тительных препаратов) Arbutin (raw material for the production of herbal medici- nal products)	Йодометрия Iodometric titration	Не менее 4,5% Not less than 4.5%	ГФ XI Ph. Rus. 11
		УФ-СФМ UV-SP	Не менее 4,5% Not less than 4.5%	ГФ XIV Ph. Rus. 14
	Экстрактивные вещества, из- влекаемые водой (сырье для производства экстрактов) Water-extractable substances (raw material for the produc- tion of extracts)	Гравиметрия Gravimetry	Не менее 18% Not less than 18%	ГФ XIV Ph. Rus. 14
Толокнянки обыкновенной листья Bearberry leaf	Арбутин (сырье для произ- водства лекарственных рас- тительных препаратов) Arbutin (raw material for the production of herbal medici- nal products)	Йодометрия Iodometric titration	Не менее 6% Not less than 6%	ГФ XI Ph. Rus. 11
		УФ-СФМ UV-SP	Не менее 6% Not less than 6%	ГФ XIV Ph. Rus. 14
	Экстрактивные вещества, из- влекаемые водой (сырье для производства экстрактов) Water-extractable substances (raw material for the produc- tion of extracts)	Гравиметрия Gravimetry	Не менее 18% Not less than 18%	ГФ XIV Ph. Rus. 14
Бадана корневища Bergenia rhizome	Дубильные вещества Tannins	Перманганометрия Permanganometry	Не менее 20% Not less than 20%	ГФ XIV Ph. Rus. 14
	Арбутин Arbutin	ТСХ TLC	Определяется качественно Qualitative test	ГФ XIV Ph. Rus. 14
Урифлорин® Uriflorin®	Сумма фенологликозидов в пересчете на арбутин Total content of phenogly- cosides expressed as arbutin	УФ-СФМ UV-SP	Не менее 0,028 г/табл. (Не менее 9% от содер- жания толокнянки) Not less than 0.028 g/tablet (Not less than 9% of Bearberry leaf content)	Урифлорин, таблетки. ФСП 42-0068-4130-03 Uriflorin, tablets. Manufacturer's monograph FSP 42-0068-4130-03
Бруснивер® Brusniver®	Производные гидрохинона в пересчете на безводный арбутин Hydroquinone derivatives ex- pressed as anhydrous arbutin	Вид-СФМ Vis-SP	Не менее 2% Not less than 2%	Бруснивер сбор. ФСП 42-0309-5493-04 Brusniver, herbal mixture. Manufacturer's monograph FSP 42-0309-5493-04
	Дубильные вещества Tannins	Перманганометрия Permanganometry	Не менее 9% Not less than 9%	Бруснивер сбор. ФСП 42-0309-5493-04 Brusniver, herbal mixture. Manufacturer's monograph FSP 42-0309-5493-04
Бруснивер-Т Brusniver-T	Производные гидрохинона в пересчете на безводный арбутин Hydroquinone derivatives ex- pressed as anhydrous arbutin	Вид-СФМ Vis-SP	Не менее 2% Not less than 2%	Бруснивер-Т. ФСП 42-0309-5492-04 Brusniver-T. Manufacturer's monograph FSP 42-0309-5492-04
	Дубильные вещества Tannins	Перманганометрия Permanganometry	Не менее 9% Not less than 9%	Бруснивер-Т. ФСП 42-0309-5492-04 Brusniver-T. Manufacturer's monograph FSP 42-0309-5492-04
Мочегонный сбор № 2 Diuretic herbal mixture, com- position No. 2	Арбутин Arbutin	Йодометрия Iodometric titration	Не менее 3,0% Not less than 3.0%	Мочегонный сбор № 2. ФС 42-1028-91 Diuretic herbal mixture, com- position No. 2. Pharmacopoeial monograph FS 42-1028-91

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

Наименование Name	Определяемое вещество Analyte	Способ определения Test method	Норма содержания Limits	Нормативный документ Official standard
Урологический (мочегонный) сбор-ф Urological (diuretic) herbal mixture-f	Арбутин Arbutin	Йодометрия Iodometric titration	Не менее 3,0% Not less than 3.0%	Урологический (мочегонный) сбор-ф. ЛП-001308; изм. № 1 к ЛП 001308-011211 Urological (diuretic) herbal mixture-f. Marketing authorisation LP-001308; amendment No. 1 to LP 001308-011211
Фитонефрол® (Урологический сбор) Phytonephrol® (Urological herbal mixture)	Производные гидрохинона в пересчете на безводный арбутин Hydroquinone derivatives expressed as anhydrous arbutin	Йодометрия Iodometric titration	Не менее 3,0% Not less than 3.0%	Фитонефрол® (Урологический сбор). ФСП 42-0309-6085-04 Phytonephrol® (Urological herbal mixture). Manufacturer's monograph FSP 42-0309-6085-04
		Вид-СФМ Vis-SP	Не менее 3,0% Not less than 3.0%	Фитонефрол® (Урологический сбор). ФСП 42-0309-6085-04 Phytonephrol® (Urological herbal mixture). Manufacturer's monograph FSP 42-0309-6085-04

Примечание. ТСХ — тонкослойная хроматография; УФ-СФМ — спектрофотометрия в ультрафиолетовой области спектра; Вид-СФМ — спектрофотометрия в видимой области спектра; ГФ XI — Государственная фармакопея СССР XI изд.; ГФ XIV — Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд.; ФСП — фармакопейная статья предприятия.

Note. TLC—thin-layer chromatography; UV-SP—ultraviolet spectrophotometry; Vis-SP—visible spectrophotometry; Ph. Rus. 11—State Pharmacopoeia of the USSR, 11th ed.; Ph. Rus. 14—State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed.

Методика 4. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [5]. Хроматографируют извлечение из лекарственного растительного препарата (ЛРП), в качестве неподвижной фазы используют октадецилсилил силикагель эндкепированный (С18), в качестве подвижных фаз — раствор формиата аммония и ацетонитрил. Детектирование: УФ-детектор, длина волны 280 нм. Содержание арбутина определяют с использованием внешнего СО.

Методика 5. Высокоэффективная жидкостная хроматография, методика включена в фармакопейную статью «Толокнянки обыкновенной листья» Европейской фармакопеи⁵. Экстракцию проводят водой на водяной бане. Подвижная фаза: метанол:вода в объемном соотношении 10:90. Неподвижная фаза: октадецилсилил силикагель эндкепированный (С18). Детектирование: УФ-детектор, длина волны 280 нм. Содержание арбутина определяют с использованием внешнего СО.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты количественного определения арбутина, полученные с помощью разных методик, могут значительно различаться (табл. 4), что может быть связано с рядом факторов.

Йодометрическая методика определения арбутина является наиболее трудоемкой из предложенных — ее проведение может занимать до 6 ч, что может приводить к снижению воспроизводимости и точности. Также общим недостатком

титриметрических методик, основанных на визуальной детекции конечной точки титрования по изменению окраски индикатора, является субъективность установления точки эквивалентности.

Согласно данным литературы, осаждение сопутствующих полифенольных соединений раствором ацетата свинца основного, применяющееся в йодометрической методике, может приводить к потере до 1,5% арбутина [6], а очистка извлечения на колонке с оксидом алюминия, характерная для методики № 2 (УФ-спектрофотометрия), — до 15% арбутина [7]. Несмотря на возможную потерю арбутина во время пробоподготовки, результаты, полученные с помощью йодометрического титрования, не отличались в значительной степени от полученных с помощью большинства других методик определения арбутина.

Результаты, полученные методом УФ-спектрофотометрии, значительно отличались от полученных другими методами. Предположительно это связано с тем, что часть веществ, поглощающих излучение с длиной волны около 285 нм, элюируется с колонки вместе с арбутином, что приводит к завышению результатов испытания. Это подтверждают результаты, полученные в ходе работы (рис. 1а). Спектр поглощения образца, содержащего экстракт препарата Бруснивер®, в значительной степени отличается от спектра стандартного образца арбутина, в отличие от спектра образца, содержащего экстракт толокнянки обыкновенной

⁵ Monograph 07/2013:1054 Bearberry leaf. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg: EDQM; 2020

Таблица 3. Сравнение условий методик количественного определения арбутина

Table 3. Arbutin assays conditions comparison

Условия Conditions		Методика 1 Procedure 1	Методика 2 Procedure 2	Методика 3 Procedure 3	Методика 4 Procedure 4	Методика 5 Procedure 5
Экстрагент Extracting agent		Вода Water	70% спирт 70% ethanol	Вода Water	40% спирт (толок- нянки обыкновен- ной листья) или вода (брусники листья) 40% ethanol (Bearberry leaf) or Water (Lingonberry leaves)	Вода Water
Соотношение сырье:экстрагент Herbal substance/ extracting agent ratio		1:150	1:200	1:50	1:110	1:50
Продолжительность экстракции, мин Extraction time, min		30	45	30	60	30
Продолжительность по- вторной экстракции, мин Second extraction time, min		20	Не проводится Not applicable	Не проводится Not applicable	Не проводится Not applicable	30
Нагрев Heating		Водяная баня Water bath	Водяная баня Water bath	Водяная баня Water bath	Водяная баня Water bath	Водяная баня Water bath
Фильтрация Filtration		Бумажный фильтр Paper filter	Бумажный фильтр Paper filter	Вата Absorbable cotton	Марля Gauze	Вата, бумаж- ный фильтр Absorbable cot- ton, paper filter
Очистка Purification		Осаждение со- путствующих соединений свинца(II) ацетатом основным Precipitation of concomitant compounds with lead(II) acetate basic	Колонка с алюми- ния оксидом Aluminum oxide column	Извлечение окрашен- ных продуктов реак- ции дихлорметаном Extraction of coloured reaction products with dichloromethane	Не проводится Not applicable	Не проводится Not applicable
Метод определения Method		Йодометрия Iodometric titration	УФ-спектро- фотометрия UV-spectrophoto- metry	Спектрофотометрия в видимой области Visible spectrophotometry	ВЭЖХ HPLC	ВЭЖХ HPLC
Аналитическая длина волны, нм Analytical wavelength, nm		Неприменимо Not applicable	285	455	280	280
Расчет Calculation		1 мл 0,1 М раствора йода соответствует 0,01361 г арбутина 1 mL of 0.1 M iodine solution is equivalent to 0.01361 g of arbutin	Стандартный обра- зец арбутина или Удельный показатель поглощения ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 72$) Arbutin reference standard or Specific absorbance ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 72$)	Удельный показатель поглощения ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 648$) Specific absorbance ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 648$)	Стандартный образец арбутина Arbutin reference standard	Стандартный образец арбу- тина Arbutin refer- ence standard
Теоретическая концентрация арбутина в ис- пытуемом рас- творе, мкг/мл Theoretical concentration of arbutin in the test solution, µg/mL	Толокнян- ки обыкновенной листья, Bearberry leaf	0,300	0,036	0,012	0,048	0,960
	Брус- нивер®, Brusniver®	0,100	0,012	0,004	0,016	0,320
Длительность одного испытания, ч Duration of one test, h		6	2	3	2,5	3

Таблица 4. Результаты испытаний

Table 4. Test results

Методика Procedure		Толокнянки обыкновенной листья Bearberry leaf		Бруснивер® Brusniver®	
№	Метод Method	результат, % result, %	норма, % limit, %	результат, % result, %	норма, % limit, %
1	Титриметрия Titrimetry	9,3 (0,78)	Не менее 6,0 Not less than 6.0	3,9 (0,80)	—
2	УФ-спектрофотометрия UV-spectrophotometry	13,0 (1,02)	Не менее 6,0 Not less than 6.0	5,4 (1,08)	—
3	Спектрофотометрия в видимой области Visible spectrophotometry	9,1 (1,04)	—	2,5 (1,09)	Не менее 2,0 Not less than 2.0
4.1	ВЭЖХ (пик арбутина 1) HPLC (arbutin peak 1)	8,7 (0,91)	—	2,6 (0,87)	—
4.2	ВЭЖХ (сумма площадей пиков арбутина) HPLC (sum of arbutin peak areas)	8,3 (0,99)	—	2,4 (1,10)	—
5	ВЭЖХ HPLC	8,8 (0,80)	Не менее 7,0 Not less than 7.0	2,5 (0,89)	—

Примечание. В скобках указано значение относительного стандартного отклонения (RSD, %), «—» — норма не установлена.
Note. The relative standard deviation (RSD, %) is given in brackets, “—” — the limit is not set.

листьев, что, скорее всего, связано с более низкой концентрацией арбутина и недостаточной очисткой извлечения из сбора.

В свою очередь, спектры, полученные по методике № 3 (рис. 1b), имеют характерный максимум поглощения при длине волны около 455 нм и совпадают по профилю со спектром стандартного образца арбутина. Следует отметить относительно трудоемкую пробоподготовку по данной методике, которая может повлечь за собой высокую погрешность результатов испытаний. Также необходимо обратить внимание на использование в расчетах удельного показателя поглощения, что, в свою очередь, влияет на межлабораторную прецизионность (сходимость

результатов разных лабораторий) при использовании данной методики.

Методики ВЭЖХ обладают наибольшей специфичностью среди сравниваемых методик, что определяется особенностями данного аналитического метода, однако требуют использования стандартного образца арбутина. Обращает на себя внимание тот факт, что при выполнении испытаний по методике № 4 на хроматограмме стандартного образца арбутина присутствуют два пика, которые также можно отметить и на хроматограммах испытуемых растворов (рис. 2а). По условиям методики, второй пик не используется в расчетах. Если проводить вычисления по сумме пиков, то результаты получаются

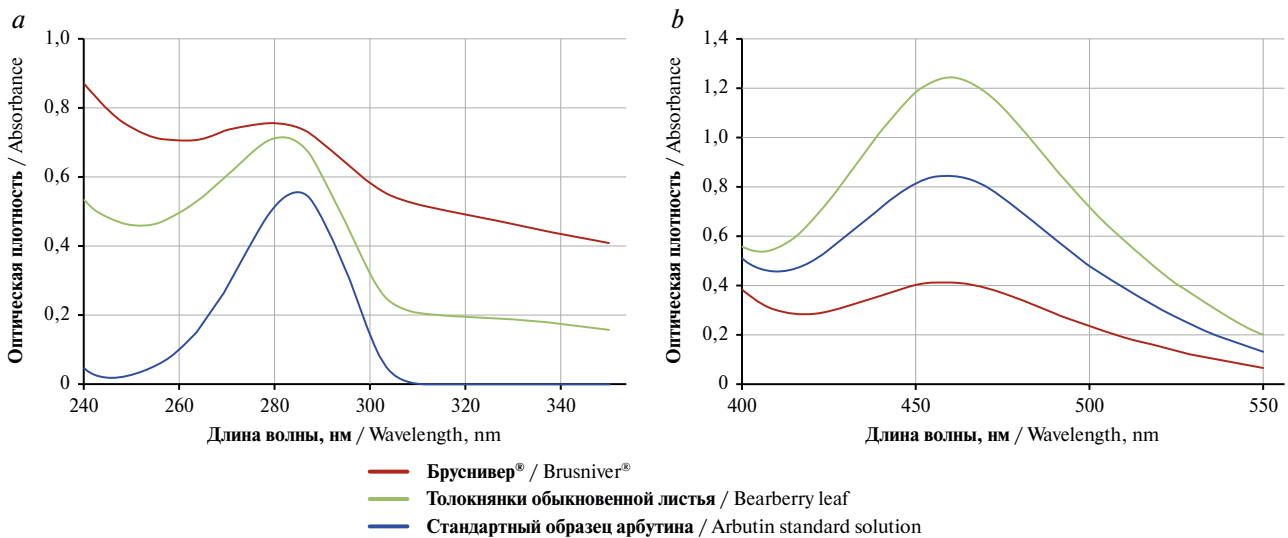


Рис. 1. Спектры поглощения растворов стандартного и испытуемых образцов, полученные по: (а) методике № 2 — УФ-спектрофотометрия, (b) методике № 3 — спектрофотометрия в видимой области
Fig. 1. Absorption spectra of the standard and test solutions obtained by: (a) test procedure No. 2, UV-spectrophotometry, (b) test procedure No. 3, visible spectrophotometry

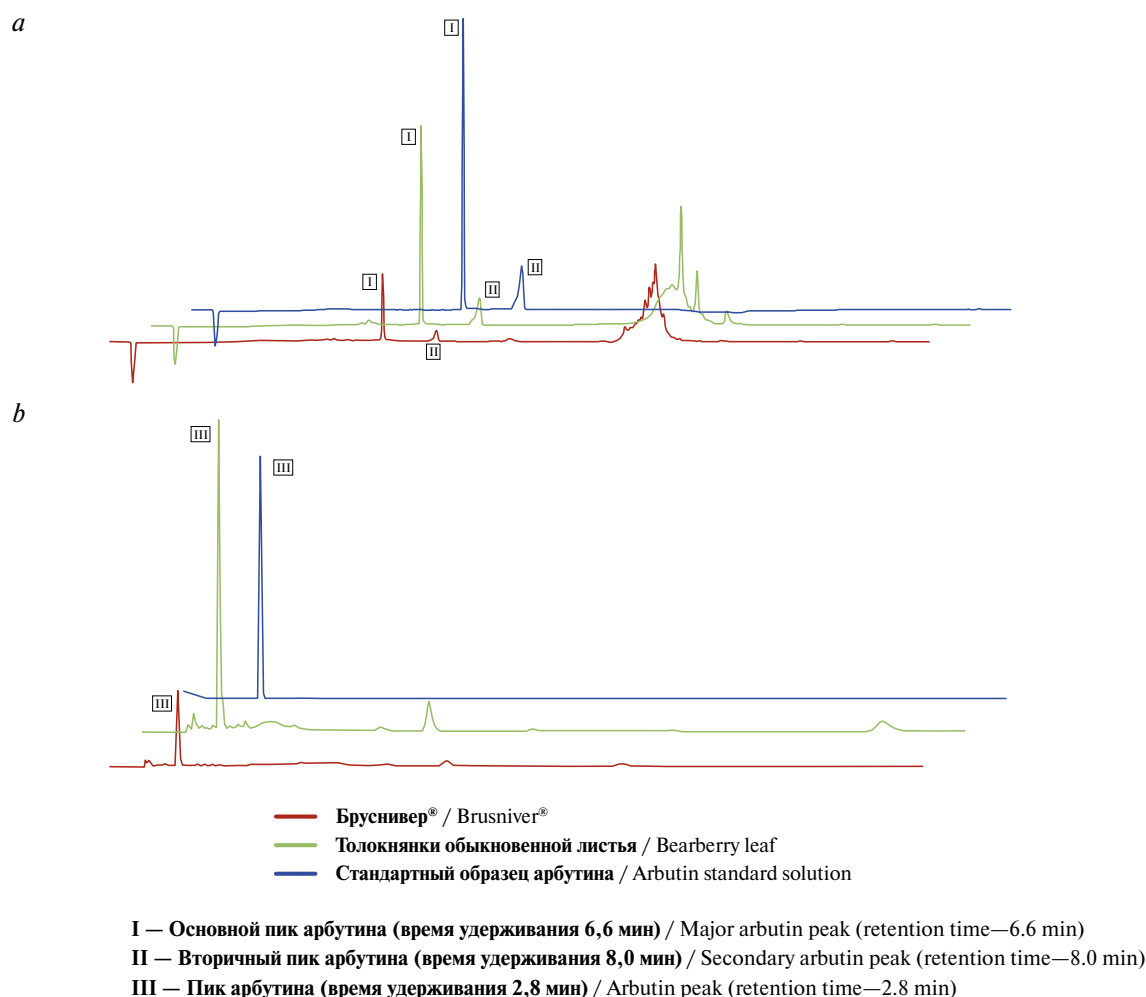


Рис. 2. Хроматограммы растворов стандартного и испытуемых образцов, полученные по: (а) методике № 4 — ВЭЖХ (время хроматографирования — 20 мин), (б) методике № 5 — ВЭЖХ (время хроматографирования — 30 мин)

Fig. 2. Chromatograms of the standard and test solutions obtained by: (a) test procedure No. 4, HPLC (run time—20 min), (b) test procedure No. 5, HPLC (run time—30 min)

немного заниженными (табл. 4). При выполнении испытаний методом ВЭЖХ в условиях методики № 5 второго пика арбутина не наблюдается (рис. 2б).

ВЫВОДЫ

1. Проведена сравнительная оценка пяти методик количественного определения арбутина, включенных в утвержденные фармакопейные статьи и нормативные документы на арбутинсодержащие препараты.

2. По результатам испытаний установлено, что методики не могут использоваться как взаимозаменяемые, нормы содержания арбутина, определенного по конкретной методике, должны быть установлены в условиях каждой конкретной методики.

3. Йодометрическая методика является наиболее трудоемкой и времязатратной, определение конечной точки титрования является субъективным.

4. Спектрофотометрические методики позволяют проводить испытания без использования

стандартного образца арбутина и могут давать завышенные результаты по сравнению с методиками ВЭЖХ и титриметрии.

5. Методики ВЭЖХ являются более селективными, однако требуют использования стандартных образцов.

6. Для целей контроля качества ЛРП могут быть предложены методики ВЭЖХ и спектрофотометрии в видимой области; рекомендуется замена титриметрической методики альтернативной.

Вклад авторов. Н. П. Антонова — идея, концепция, дизайн и планирование исследования; С. С. Прохвятилова — формулировка выводов; Е. П. Шефер — обобщение результатов исследования и интерпретация результатов; А. М. Калинин — редактирование и переработка рукописи; И. М. Моргунов — работа с литературными источниками; Т. А. Голомазова — проведение практических испытаний; У. С. Легонькова — написание чернового варианта статьи.

Authors' contributions. Natalia P. Antonova—elaboration of the study idea, concept, and design, planning of the study; Svetlana S. Prokhvatilova—drafting of conclusions; Elena P.

Shefer—consolidation and interpretation of the results; **Artem M. Kalinin**—editing and revision of the draft; **Igor M. Morgunov**—literature review; **Tatiana A. Golomazova**—experimental part of the study; **Uliana S. Legon'kova**—preparation of the draft.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

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

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Волобой НЛ, Смирнов ИВ, Бондарев АА. Особенности мочегонной активности арбутина и гидрохинона. *Сибирский медицинский журнал*. 2012;27(3):131–4. [Voloboy NL, Smirnov IV, Bondarev AA. Features of diuretic activity of arbutin and hydroquinone. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*. 2012;27(3):131–4 (In Russ.)]
2. Брюханов ВМ, Смирнов ИВ, Бондарев АА, Талалаева ОС, Шабанова ВМ, Зверев ЯФ, Удут ВВ. Влияние арбутина и гидрохинона на процессы свободно-радикального окисления в крови крыс. *Биомедицина*. 2011;1(1):41–9. [Bryukhanov VM, Smirnov IV, Bondarev AA, Talalaeva OS, Shabanova VM, Zverev YaF, Uduv VV. Arbutin's and hydroquinone's influence on free radical oxidation in rats blood. *Biomeditsina = Biomedicine*. 2011;1(1):41–9 (In Russ.)]
3. Волобой НЛ, Бутакова ЛЮ, Смирнов ИВ. Изучение антимикробного действия арбутина и гидрохинона в отношении некоторых представителей грамтрицательной флоры. *Химия растительного сырья*. 2013;(1):179–82. [Voloboy NL, Butakova LYu, Smirnov IV. Study of antimicrobial arbutin and hydroquinone in certain gram-flora of representatives. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of Plant Raw Materials*. 2013;(1):179–82 (In Russ.)]
4. Hori I, Nihei K, Kubo I. Structural criteria for depigmenting mechanism of arbutin. *Phytother Res*. 2004;18(6):475–9. <https://doi.org/10.1002/ptr.1456>
5. Никулин АВ, Окунева МВ, Горьяинов СВ, Потанина ОГ. Разработка и валидация методики определения арбутина в листьях толокнянки методом ВЭЖХ/УФ. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(8):29–33. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-8-29-33> [Nikulina AV, Okuneva MV, Goryainov SV, Potanina OG. Development and validation of an HPLC-UV method for arbutin determination in bearberry leaves. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(8):736–40. <https://doi.org/10.1007/s11094-019-02071-3>]
6. Федосеева ЛМ. Анализ арбутина подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch.), произрастающего на Алтае. *Химия растительного сырья*. 2003;(1):73–7. [Fedoseeva LM. Arbutin determination in underground and herbal parts of *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch, growing in Altai. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of Plant Raw Materials*. 2003;(1):73–7 (In Russ.)]
7. Фурса НС, Онегин СВ. Содержание арбутина в траве вереска обыкновенного. *Фармация*. 2007;(6):12–4. [Fursa NS, Onegin SV. Arbutin levels in the ling (*Calluna vulgaris*). *Farmatsiya = Pharmacy*. 2007;(6):12–4 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

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

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

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

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

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

Голомазова Татьяна Александровна. *Tatiana A. Golomazova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9917-9367>

Легонькова Ульяна Сергеевна. *Uliana S. Legon'kova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-4646-0876>

Статья поступила 13.11.2020

После доработки 14.01.2021

Принята к печати 31.05.2021

Article was received 13 November 2020

Revised 14 January 2021

Accepted for publication 31 May 2021

Стабильность готовых и приготовленных в лаборатории питательных сред

С. И. Кулешова*, С. А. Процак, С. А. Лисунова, Г. Ю. Романюк

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 питательных сред, которое зависит в большой степени от ростовых свойств каждой используемой в испытании питательной среды, определяет достоверность и корректность получаемых результатов при анализе лекарственных средств microbiологическими методами. Процедура приготовления питательной среды достаточно трудоемка и включает в себя несколько этапов: последовательное растворение ингредиентов в точном соответствии с рецептурой (качественный и количественный состав), стерилизацию, корректировку pH среды, проверку ростовых свойств, поэтому важно установить стабильность каждой конкретной питательной среды. **Цель работы:** изучение ростовых свойств питательных сред, приготовленных в лаборатории из сухой смеси, и оценка их стабильности при длительном хранении. **Материалы и методы:** для проведения испытания по оценке стабильности питательных сред использовали приготовленные в лаборатории жидкую тиогликолевую среду и жидкую соево-казеиновую среду. Ростовые свойства тиогликолевой среды определяли с помощью тест-микроорганизмов *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; соево-казеиновой среды — *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Изучение стабильности проводили в течение 6 месяцев, оценивая изменение внешнего вида и ростовых свойств. Испытуемые среды хранились при комнатной температуре и в холодильной камере при температуре 2–8 °C. **Результаты:** на приготовленной тиогликолевой среде через 3 месяца независимо от условий хранения не отмечен рост анаэробного микроорганизма *Clostridium sporogenes*, в дальнейшем не наблюдался рост грамположительных микроорганизмов *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*, которые более чувствительны к условиям хранения приготовленной питательной среды, чем *Pseudomonas aeruginosa*. Ростовые свойства приготовленной в лаборатории соево-казеиновой среды в течение 6 месяцев хранения не изменились. **Выводы:** тиогликолевая среда, приготовленная из сухой смеси, стабильна и сохраняет свои ростовые свойства не более двух месяцев при хранении в холодильной камере при температуре 2–8 °C. Соево-казеиновая среда может оставаться стабильной в течение 6 месяцев как при комнатной температуре, так и при хранении в холодильной камере. **Ключевые слова:** питательные среды; стабильность питательной среды; ростовые свойства; тест-микроорганизмы; условия хранения

Для цитирования: Кулешова СИ, Процак СА, Лисунова СА, Романюк ГЮ. Стабильность готовых и приготовленных в лаборатории питательных сред. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(2):130–134. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-130-134>

* Контактное лицо: Кулешова Светлана Ивановна, Kuleshova@expmed.ru

Stability of Ready-to-Use and Laboratory-Prepared Culture Media

S. I. Kuleshova*, S. A. Protsak, S. A. Lisunova, G. Yu. Romanyuk

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

Abstract. The culture media quality, which depends to a large extent on growth promotion properties, determines the reliability and accuracy of test results obtained by microbiological methods. The procedure for culture media preparation is quite labour-consuming and includes several stages: successive dissolution of components exactly as specified in the recipe (qualitative and quantitative composition), sterilisation, adjusting the pH of the medium, and testing of growth promotion properties—therefore it is important to demonstrate the stability of each particular culture medium. **The aim of the study** was to evaluate growth promotion properties of the culture media prepared in the laboratory from a dry mixture, and to assess their stability during long-term storage. **Materials and methods:** stability testing was performed for fluid thioglycollate medium (FTM) and soybean-casein digest broth (SCD) prepared in the laboratory. FTM growth promotion properties were tested using the following test microorganisms: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. SCD growth promotion properties were tested using: *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. The stability study was carried out for 6 months, assessing changes in appearance and growth promotion properties. The test media were stored at room temperature and in a refrigerator at 2–8 °C. **Results:** no growth of the anaerobic microorganism *Clostridium sporogenes* was observed in FTM after 3 months, regardless of storage conditions. Later on, there was no growth of the gram-positive microorganisms *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, which are more sensitive to the storage conditions than *Pseudomonas aeruginosa*. The growth promotion properties of the SCD prepared in the laboratory did not change during 6 months of storage. **Conclusions:** FTM prepared from a dry mixture remains stable and retains its growth promotion properties for no more than two months when stored in a refrigerator at 2–8 °C. SCD can remain stable for 6 months, both at room temperature and when stored in the refrigerator.

Key words: culture media; culture media stability; growth promotion properties; test microorganisms; storage conditions

For citation: Kuleshova SI, Protsak SA, Lisunova SA, Romanyuk GYu. Stability of ready-to-use and laboratory-prepared culture media. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(2):130–134. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-130-134>

* **Corresponding author:** Svetlana I. Kuleshova; Kuleshova@expmed.ru

Питательные среды являются важными материалами для проведения лабораторных микробиологических исследований [1, 2]. Качество питательных сред в большой степени влияет на достоверность анализа лекарственных средств (ЛС) микробиологическими методами (тесты на микробиологическую чистоту ЛС, стерильность) [3]. Для ЛС, к которым предъявляется требование «Стерильность» (инъекционные препараты, глазные капли и мази и т.д.), испытание на стерильность является обязательной процедурой. При проведении испытания внимание уделяется не только непосредственно определению показателя «Стерильность» в строгом соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации (ГФ РФ)¹, но и всем подготовительным этапам анализа, в том числе приготовлению питательных сред, включая в обязательном порядке проверку их ростовых свойств.

ГФ РФ для постановки теста «Стерильность» рекомендованы жидкие питательные среды: тиогликолевая среда для выявления аэробных и анаэробных бактерий, соево-казеиновая среда для выявления грибов и аэробных бактерий, среда Сабуро для выявления грибов. Процедура приготовления питательной среды достаточно трудоемкая и включает несколько этапов: изготовление среды в точном соответствии с рецептурой, стерилизацию, корректировку pH среды. В ОФС «Стерильность» указано, что срок хранения приготовленных питательных сред может составлять не более 1 месяца при температуре от 2 до 25 °С. Оговаривается, что допускаются иные условия и сроки годности питательных сред, которые должны быть подтверждены. Таким образом, для оптимизации работы микробиологических лабораторий с целью экономии материальных ресурсов и трудозатрат необходимо оценить стабильность питательных сред, используемых при оценке стерильности лекарственных средств.

Цель работы — изучение ростовых свойств питательных сред, приготовленных в лаборатории из сухих смесей, и оценка их стабильности при длительном хранении для подтверждения увеличенного срока годности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения испытания по оценке стабильности питательных сред использовали приготовленные в лаборатории жидкую тиогликолевую среду и жидкую соево-казеиновую среду. Тиогликолевая среда изготовлена 18.12.2019 из сухой смеси Fluid Thioglycollate medium серии VM766091 (Merck),

прописью которой полностью соответствует прописи, приведенной в ОФС «Стерильность». Соево-казеиновая среда изготовлена 18.12.2019 из сухой смеси Tryptic Soy Broth серии VM785759 (Merck), прописью которой также полностью соответствует прописи, приведенной в ОФС «Стерильность». В лаборатории присвоены номера серий вышеуказанных сред по дате изготовления: для обеих сред — 011219. Стерилизация изготовленных питательных сред и корректировка pH проведена в соответствии с требованиями ГФ РФ. Каждую среду объемом 100 мл разливали во флаконы, которые герметично закупоривали резиновыми пробками с обкаткой алюминиевыми колпачками. В качестве контроля использовали готовые жидкие среды (Merck): тиогликолевая среда (Thioglycoll. B. 100 ml clear) серий 156514 и 157666, соево-казеиновый бульон (Tryptic Soy B) серий 156529 и 157945.

Ростовые свойства тиогликолевой среды проверяли с использованием тест-микроорганизмов *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, соево-казеиновой среды — *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. В 10 мл среды вносили тест-микроорганизмы в количестве от 10 до 100 КОЕ. Тест-микроорганизмы были выбраны в соответствии с рекомендациями ГФ РФ². Количество микроорганизмов устанавливали по стандарту мутности, аттестованному в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, с последующим прямым посевом на чашки Петри с питательными средами Tryptic Soy Agar EP+USP (Merck) для определения концентрации бактерий, Sab. Dextrose (4%) A. acc EP (Merck) для определения грибов, Anaerobic Agar (HiMedia) для определения анаэробов.

Приготовленные питательные среды были проверены на стерильность и затем разделены на две партии. Образцы одной партии хранили при комнатной температуре 20–25 °С, другой — помещали в холодильную камеру 2–8 °С. Изучение стабильности проводили в течение 6 мес., оценивая изменение внешнего вида и ростовые свойства. По истечении срока хранения приготовленные питательные среды были проверены на стерильность. Обе среды независимо от условий хранения были стерильны.

Для проверки ростовых свойств использовали один флакон каждой из исследуемых сред, содержимое которого разливали в асептических условиях в пробирки по 10 мл. Температуру флаконов,

¹ ОФС.1.2.4.0003.15. Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. М.; 2018.

² ОФС.1.2.4.0002.18. Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. М.; 2018.

которые были помещены в холодильную камеру, предварительно доводили до комнатной. В 10 мл среды вносили от 10 до 100 КОЕ каждого из вышеперечисленных тест-микроорганизмов по отдельности. Посевы на тиогликолевой среде инкубировали при температуре $32,5 \pm 2,5$ °C в течение 48 ч, посевы на соево-казеиновой среде — при температуре $22,5 \pm 2,5$ °C в течение 72 ч. Испытуемые образцы в пробирках просматривали ежедневно. Аналогичным образом изучали готовые жидкие среды, которые использовали в качестве контроля. Ростовые свойства оценивали визуально по типичному росту на жидкой тиогликолевой среде или соево-казеиновой среде: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 — помутнение среды (неравномерное, хлопьями), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P — равномерное помутнение среды, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 — помутнение среды с образованием пленки сверху, *Clostridium sporogenes* ATCC 19404 — помутнение среды с наличием зоны аэробнообразования, газообразование, специфический запах, *Candida albicans* ATCC 10231 — придонный рост (белый осадок на дне), *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 — рост в виде пушистых белых шариков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проверки ростовых свойств приготовленной в лаборатории тиогликолевой сре-

ды представлены в таблице 1. После хранения как при комнатной температуре, так и в холодильной камере во флаконах не отмечена розовая окраска в верхней части объема питательной среды, что свидетельствует об отсутствии аэрации питательной среды в процессе хранения. Через три месяца независимо от условий хранения не наблюдался рост анаэробного микроорганизма *Clostridium sporogenes*. Последующее испытание на наличие роста тест-микроорганизмов, заявленных в исследовании, подтвердило невозможность применения данной среды при длительном хранении. Не отмечен рост грамположительных микроорганизмов *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*, которые оказались более чувствительны к условиям хранения приготовленной питательной среды по сравнению с *Pseudomonas aeruginosa*. При этом готовая жидкая тиогликолевая среда, оставленная при комнатной температуре, не изменила своих качеств в течение 6 мес. (табл. 2).

Наблюдались некоторые отличия между исследуемыми партиями испытуемой тиогликолевой среды. Приготовленные одновременно и разделенные по условиям хранения партии среды различались и по внешнему виду, и по скорости роста тест-микроорганизмов. Через два месяца среда, хранящаяся при комнатной температуре, стала более темной, чем партия среды,

Таблица 1. Результаты проверки ростовых свойств тиогликолевой среды № 011219

Table 1. Growth promotion test results for thioglycollate medium No. 011219

Тест-микроорганизм Test microorganism	Условия хранения среды 20–25 °C Storage at 20–25 °C					Условия хранения среды 2–8 °C Storage at 2–8 °C				
	Дата проведения эксперимента Date of the experiment									
	18.12.2019	28.01.2020	18.02.2020	19.03.2020	13.07.2020	18.12.2019	28.01.2020	18.02.2020	19.03.2020	13.07.2020
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	P	P	P	P	HP	P	P	P	P	HP
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	P	P	P	P	HP	P	P	P	P	HP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	P	P	P	HP	HP	P	P	P	HP	HP

Примечание. P — наличие роста тест-микроорганизма, HP — отсутствие роста микроорганизма.

Note. P—growth of the test microorganism detected, HP—no growth of the test microorganism detected.

Таблица 2. Результаты проверки ростовых свойств жидкой тиогликолевой среды серия 157666 (Merck) (контроль)

Table 2. Growth promotion test results for fluid thioglycollate medium, batch 157666 (Merck) (control)

Тест-микроорганизм Test microorganism	Условия хранения среды 20–25 °C Storage 20–25 °C				
	Дата проведения эксперимента Date of the experiment				
	18.12.2019	28.01.2020	18.02.2020	19.03.2020	13.07.2020
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	P	P	P	P	P
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	P	P	P	P	P
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	P	P	P	P	P
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	P	P	P	P	P

Примечание. P — наличие роста тест-микроорганизма.

Note. P—growth of the test microorganism detected.

Таблица 3. Результаты проверки ростовых свойств соево-казеиновой среды № 011219
Table 3. Growth promotion test results for soybean-casein digest broth No. 011219

Тест-микроорганизм Test microorganism	Условия хранения среды 20–25 °С Storage at 20–25 °C					Условия хранения среды 2–8 °С Storage at 2–8 °C				
	Дата проведения эксперимента Date of the experiment									
	18.12. 2019	28.01. 2020	18.02. 2020	19.03. 2020	13.07. 2020	18.12. 2019	28.01. 2020	18.02. 2020	19.03. 2020	13.07. 2020
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

Примечание. P — наличие роста тест-микроорганизма
Note. P—growth of the test microorganism detected.

Таблица 4. Результаты проверки ростовых свойств соево-казеиновой среды (Merck) серия 157945 (контроль)
Table 4. Growth promotion test results for soybean-casein digest broth, batch 157945 (Merck) (control)

Тест-микроорганизм Test microorganism	Условия хранения среды 20–25 °С Storage at 20–25 °C				
	Дата проведения эксперимента Date of the experiment				
	18.12.2019	28.01.2020	18.02.2020	19.03.2020	13.07.2020
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	P	P	P	P	P
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	P	P	P	P	P
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	P	P	P	P	P

Примечание. P — наличие роста тест-микроорганизма.
Note. P—growth of the test microorganism detected.

помещенная в холодильную камеру. Визуально рост *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* на среде, оставленной при комнатной температуре, наблюдали на сутки позже по сравнению со средой хранящейся в холодильной камере, что, возможно, обусловлено изменением количества и качества питательных веществ, необходимых для роста тест-культур. Для более точной оценки выявленных отличий необходимы дальнейшие детальные исследования.

Рост тест-микроорганизмов на жидкой готовой среде (контроль) наблюдали в течение всего периода хранения (табл. 2). Результаты проверки ростовых свойств приготовленной в лаборатории соево-казеиновой среды представлены в таблице 3. Значимых отличий между испытываемыми партиями не обнаружено. Рост тест-микроорганизмов наблюдался в течение 6 мес. и не отличался от контроля (табл. 3, 4).

Выводы

Проведенные исследования показали, что тиюгликолевая среда, приготовленная из сухой смеси, стабильна и сохраняет свои ростовые свойства не более двух месяцев при хранении в холодильной камере при температуре 2–8 °С. Соево-казеиновая среда может оставаться стабильной в течение 6 мес. как при комнатной температуре, так и при хранении в холодильной камере.

Вклад авторов. С. И. Кулешова — планирование исследования, анализ литературы, интерпретация результатов исследования, написание статьи; С. А. Протсак — идея, приготовление питательных сред, интерпретация результатов исследования; С. А. Лисунова — работа с тест-микроорганизмами, определение ростовых свойств питательных сред, интерпретация результатов; Г. Ю. Романюк — приготовление питательных сред, проверка ростовых свойств питательных сред.
Authors' contributions. Svetlana I. Kuleshova—planning of the study, literature review, interpretation of the study findings, writing of the text; Svetlana A. Protsak—elaboration of the study idea, preparation of the culture media, interpretation of the study findings; Svetlana A. Lisunova—experimental work with test microorganisms, assessment of culture media growth promotion properties, interpretation of the findings; Galina Yu. Romanyuk—preparation of the culture media, testing of culture media growth promotion properties.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).
Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Поляк МС, Сухаревич ВИ, Сухаревич МЭ. *Питательные среды для медицинской микробиологии*. СПб.; 2002. [Polyak MS, Sukharevich VI, Sukharevich ME. *Nutrient media for medical microbiology*. Saint Petersburg; 2002 (In Russ.)]
- Шепелин АП. Современное состояние и направление развития производства питательных сред в России. В кн.: *Инновации в медицинской, фармацевтической, ветеринарной и экологической микробиологии*. СПб.: Человек и его здоровье; 2017. [Shepelin AP. Current state and direction of development of nutrient media production in Russia. In: *Innovations in medical, pharmaceutical, veterinary and environmental microbiology*. Saint Petersburg: Chelovek i ego zdorovie; 2017 (In Russ.)]
- Гунар ОВ, Сахно НГ, Рощина МВ. Сравнительное изучение питательных сред, используемых для определения стерильности лекарственных средств. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2015;2:3–8. [Gunar OV, Sakhno NG, Roshchina MV. Comparative study of media for medicines sterility testing. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2015;2:3–8 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Кулешова Светлана Ивановна, канд. биол. наук. *Svetlana I. Kuleshova*, Cand. (Biol). **ORCID**: <https://orcid.org/0000-0002-9103-9239>
Процак Светлана Александровна. *Svetlana A. Protsak*. **ORCID**: <https://orcid.org/0000-0003-2153-4223>
Лисунова Светлана Анатольевна. *Svetlana A. Lisunova*. **ORCID**: <https://orcid.org/0000-0001-7164-7598>
Романюк Галина Юрьевна. *Galina Yu. Romanyuk*. **ORCID**: <https://orcid.org/0000-0002-8336-6125>

Статья поступила 14.10.2020
После доработки 02.03.2021
Принята к печати 31.05.2021

Article was received 14 October 2020
Revised 2 March 2021
Accepted for publication 31 May 2021

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

ТРЕБОВАНИЯ ФАРМАКОПЕИ ЕВРАЗИЙСКОГО ЭКОНОМИЧЕСКОГО СОЮЗА К ОПРЕДЕЛЕНИЮ КАЧЕСТВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

Согласно Решению Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11.08.2020 100 «О Фармакопее Евразийского экономического союза» Фармакопея вводится в действие с 01.03.2021 и установлено, что до 1 января 2026 г. регистрационные досье лекарственных средств для медицинского применения и ветеринарных лекарственных средств должны быть приведены в соответствие с требованиями Фармакопеи ЕАЭС.

Порядок определения ростовых свойств питательных сред согласно Фармакопее ЕАЭС описан в трех ОФС, перечень разделов которых следующий:

2.1.6. Биологические испытания

2.1.6.1. СТЕРИЛЬНОСТЬ

Проверка пригодности методики испытания (определение антимикробного действия)

2. Испытание на стерильность

2.1. Отбор образцов для испытания

2.2. Метод мембранной фильтрации

2.3. Метод прямого посева

3. Питательные среды

3.1. Приготовление питательных сред

3.2. Стерильность питательных сред

3.3. Определение ростовых свойств питательных сред

3.3.1. Подготовка тест-штаммов микроорганизмов

3.3.2. Приготовление инокулята

3.4. Определение нейтрализующих свойств тиогликолевой среды

3.5. Хранение питательных сред

2.1.6.6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ: ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ АЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

1. Введение

2. Работа с тест-штаммами микроорганизмов

2.1. Активация лиофилизированных тест-штаммов микроорганизмов

2.2. Активация тест-штаммов микроорганизмов, хранящихся на дисках

2.3. Хранение тест-штаммов в глубокой заморозке

3. Определение антимикробного действия

3.4. Учет и интерпретация результатов антимикробного действия

3.5. Способы устранения антимикробного действия лекарственных средств

4. Отбор образцов лекарственных средств

5. Методы количественного определения аэробных микроорганизмов

6. Проверка ростовых свойств и стерильности питательных сред.

6.1. Тест-штаммы микроорганизмов

6.2. Определение ростовых свойств питательных сред

6.3. Стерильность питательных сред

7. Хранение питательных сред

8. Рекомендуемые питательные среды и растворы

2.1.6.7. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА НАЛИЧИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

1. Введение

2. Общие процедуры

3. Определение отдельных видов микроорганизмов

4. Биохимические тесты для идентификации микроорганизмов

5. Оценка качества питательных сред

5.1. Ростовые свойства питательных сред

5.2. Селективные свойства питательных сред

5.3. Диагностические свойства питательных сред

5.4. Стерильность питательных сред

5.5. Хранение питательных сред

6. Рекомендуемые питательные среды и растворы

С полным текстом Фармакопеи ЕАЭС Вы можете ознакомиться на сайте <http://www.eaeunion.org/>

Вычисление средней смертельной и минимальной смертельной дозы лекарственных средств с помощью биометрического программного обеспечения CombiStats

П. В. Шадрин*, Т. А. Батуашвили, Л. В. Симутенко, Н. П. Неугодова

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. Вычисление средней смертельной (LD_{50}) и минимальной смертельной (LD_{10}) дозы является необходимым при исследовании острой токсичности лекарственных средств, а также при определении специфической активности некоторых из них. Цель работы — разработка способа применения программы CombiStats для вычисления LD_{50} и LD_{10} лекарственных средств. Предложен пошаговый алгоритм обработки результатов биологического испытания с использованием биометрического программного обеспечения CombiStats (модель «Определение средней эффективной дозы», пробит-анализ) с преобразованием доз в простые дроби (доли от максимальной дозы) для вычисления LD_{50} и LD_{10} . Проведено сравнение результатов вычисления LD_{50} и LD_{10} , полученных при помощи программы CombiStats и с использованием электронных таблиц по методу Бласса–Миллера–Тейнтера–Прозоровского, описанному в Государственной фармакопее Российской Федерации (ОФС.1.1.0014.15). Показано, что использование CombiStats имеет в некоторых случаях преимущество перед использованием фармакопейного метода.

Ключевые слова: средняя смертельная доза; LD_{50} ; средняя эффективная доза; ED_{50} ; минимальная смертельная доза; LD_{10} ; CombiStats; биометрическое программное обеспечение; преобразование доз; лекарственные средства; змеиный яд

Для цитирования: Шадрин ПВ, Батуашвили ТА, Симутенко ЛВ, Неугодова НП. Вычисление средней смертельной и минимальной смертельной дозы лекарственных средств с помощью биометрического программного обеспечения CombiStats. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(2):135–142. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-135-142>

* **Контактное лицо:** Шадрин Павел Валерьевич; shadrin@expmed.ru

Calculation of the Median Lethal Dose and Low Lethal Dose Using the CombiStats Biometric Software

P. V. Shadrin*, T. A. Batuashvili, L. V. Simutenko, N. P. Neugodova

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

Abstract. The median lethal dose (LD_{50}) and low lethal dose (LD_{10}) are calculated in acute toxicity studies, as well as during specific activity assessment of some medicines. The aim of the study was to develop a procedure for using CombiStats to calculate LD_{50} and LD_{10} . The authors proposed a step-by-step algorithm for processing bioassay results using the CombiStats biometric software (median effective dose determination model, probit analysis) with conversion of doses to simple fractions (fractions of the maximum dose) to calculate LD_{50} and LD_{10} . They compared LD_{50} and LD_{10} calculation results obtained using CombiStats with those obtained using electronic spreadsheets according to the Bliss–Miller–Tainter–Prozorovsky method described in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (General Monograph 1.1.0014.15). It has been demonstrated that the use of CombiStats sometimes has advantages over the use of the pharmacopoeial method.

Key words: median lethal dose; LD_{50} ; median effective dose; ED_{50} ; low lethal dose; LD_{10} ; CombiStats; biometric software; dose conversion; medicinal products; snake venom

For citation: Shadrin PV, Batuashvili TA, Simutenko LV, Neugodova NP. Calculation of the median lethal dose and low lethal dose using the CombiStats biometric software. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(2):135–142. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-135-142>

* **Corresponding author:** Pavel V. Shadrin; shadrin@expmed.ru

Средняя смертельная доза (LD_{50}) и минимальная смертельная доза (LD_{10}) являются важными биологическими показателями качества лекарственных средств (ЛС), обязательными при исследовании острой токсичности ЛС на стадии доклинического изучения, а также при определении активности некоторых из них (например, змеиного и пчелиного яда). Для этого нескольким группам животных вводят разные дозы препарата, начиная с минимальной, не вызывающей гибель, и заканчивая дозой, от которой наблюдается полная гибель животных в данной группе. Результаты испытания, представляющие собой дихотомические (альтернативные) данные, обрабатывают с помощью пробит-анализа¹ [1–6].

Согласно Государственной фармакопее Российской Федерации, для расчетов можно использовать электронные таблицы, что реализовано нами при использовании метода Блисса–Миллера–Тейнтера–Прозоровского для вычисления LD_{50} и LD_{10} . Возможно также применение специального валидированного статистического программного обеспечения². Так, на основе биометрических методов, используемых для оценки качества лекарственных средств³, построены программы PLA и CombiStats. Последняя рекомендована для применения Европейским директором по качеству лекарственных средств и здравоохранения (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, EDQM)⁴.

Однако в программе CombiStats не предусмотрена возможность ввода доз с единицами измерения в миллиграммах на килограмм массы тела животного. Для вычисления LD_{50} и LD_{10} необходимо проводить преобразование доз, использованных в испытании.

Согласно руководству пользователя, в CombiStats имеются две модели обработки альтернативных данных.

1. С помощью модели «Determination ED50 — Определение средней эффективной дозы» проводят анализ S-образной кривой дозозависимости без использования стандартного образца.

Для этой модели приведены примеры определения эффективных доз вакцин, исходя из их активности (МЕ). При этом дозы приводят в логарифмическом виде и обозначают, например, « $-1,6 \log_{10}$ », « $-2,2 \log_{10}$ » и т.д.

2. Модель «Quantal responses — Все или ничего» наряду с определением эффективных доз позволяет оценить расстояние между двумя S-образными кривыми дозозависимости для определения активности

испытуемого образца вакцины или иммуноглобулина относительно стандартного образца. В этих случаях дозы указывают в виде дробей, где за единицу принимают максимальную дозу, например 1/1, 1/2, 1/4, 1/8.

На основании анализа данной информации мы предположили, что при вычислении LD_{50} и LD_{10} дозы, получаемые тест-объектами, целесообразно выражать в виде долей максимальной дозы, которую принимают за единицу и обозначают как 1/1, а расчеты проводить с применением модели «Determination ED50 — Определение средней эффективной дозы».

Таким образом, при использовании модели «Determination ED50 — Определение средней эффективной дозы» и представлении доз в виде простых дробей можно получить промежуточные результаты испытания, которые после дальнейшей обработки практически совпадают с результатами, полученными с помощью метода Блисса–Миллера–Тейнтера–Прозоровского, описанного в ОФС.1.1.0014.15⁵.

Цель работы — разработка способа применения программы CombiStats для вычисления LD_{50} и LD_{10} лекарственных средств.

Для выполнения однотипных расчетов в CombiStats создают шаблоны — специальные файлы, содержащие заранее установленные условия обработки экспериментальных данных. Поэтому для вычисления средней смертельной дозы прежде всего необходимо создать шаблон.

Для этого проводят ряд последовательных действий: нажимают кнопку **Create New template (Создать новый шаблон)** в левом верхнем углу экрана или выбирают пункт меню **File→New (Файл→Создать)**. Появляется диалоговое окно **Options wizard (Мастер настроек)** (рис. 1).

На вкладке **Size (Параметры таблиц)** вводят следующие значения полей:

Number of tables: 1 (число препаратов),

Number of information lines: 0 (число строк заголовка),

Number of pre-dilutions: 0 (число разведений),

Number of doses: 5 (число доз),

Number of replicates: 1 (число повторностей).

Для последовательного открытия следующих вкладок «Мастера настроек» используют кнопку **Next** в нижней части диалогового окна.

На вкладке **Orientation (Ориентация)** ставят флажок напротив пункта **Doses vertical** для вертикального расположения доз в таблице (рис. 2).

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. М.; 2018.

² Там же.

³ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. М.; 2018.

European Pharmacopoeia. Suppl. 10.1. Strasbourg: EDQM; 2020.

Проект фармакопей Евразийского экономического союза.

⁴ <https://www.edqm.eu/en/combistats>

⁵ Общая фармакопейная статья ОФС.1.1.0014.15. Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. М.; 2018.

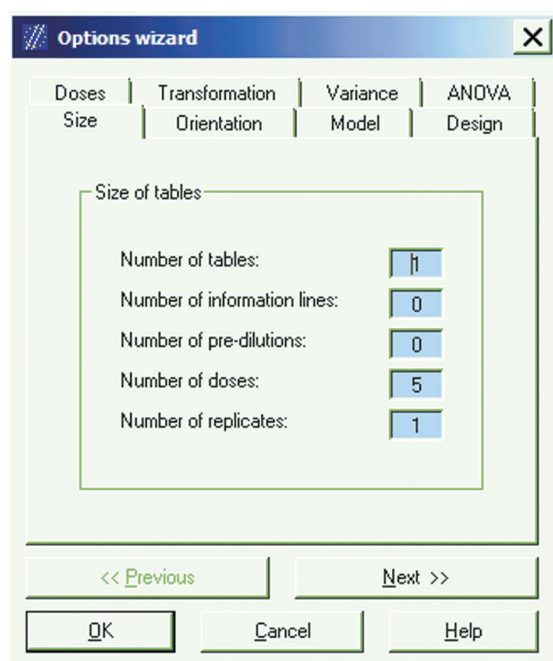


Рис. 1. Вид диалогового окна «Мастер настроек», вкладка «Параметры таблицы»

Fig. 1. Options wizard dialog box, Size of tables tab

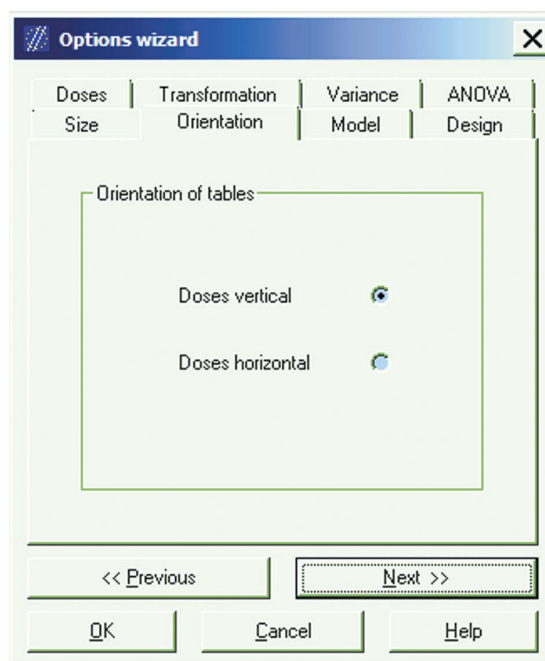


Рис. 2. Вид диалогового окна «Мастер настроек», вкладка «Ориентация»

Fig. 2. Options wizard dialog box, Orientation of tables tab

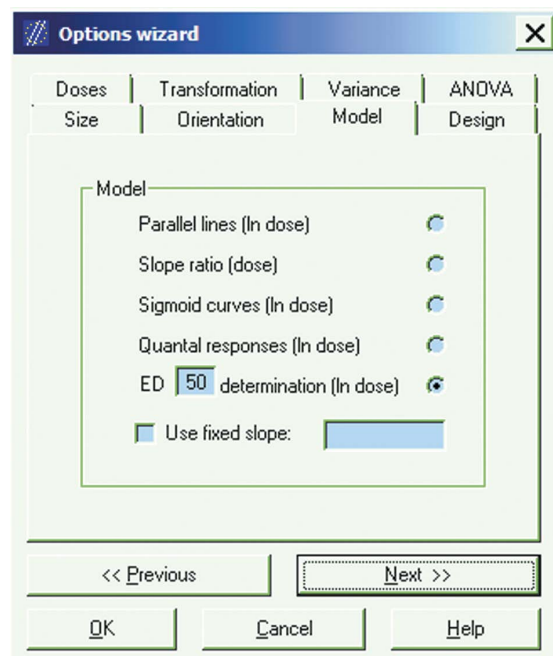


Рис. 3. Вид диалогового окна «Мастер настроек», вкладка «Модель»

Fig. 3. Options wizard dialog box, Model tab

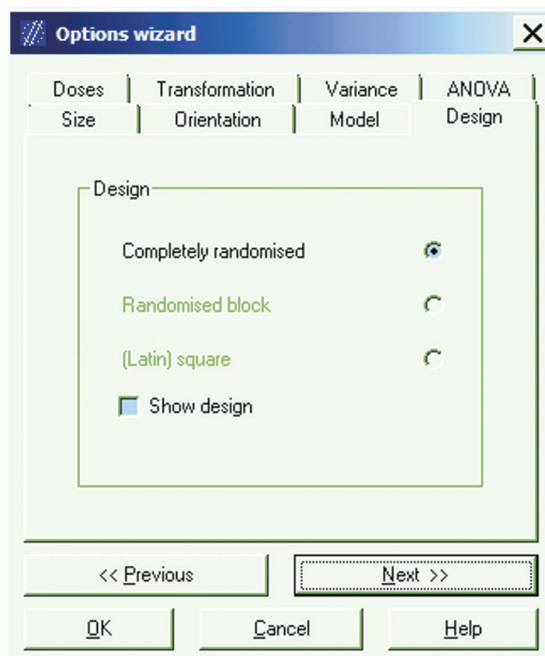


Рис. 4. Вид диалогового окна «Мастер настроек», вкладка «План»

Fig. 4. Options wizard dialog box, Design tab

Вкладка **Model (Модель)**. Поскольку вычисление смертельной дозы можно рассматривать как частный случай вычисления эффективной дозы, ставят флажок напротив пункта **ED ... determination (ln dose)** и в свободное поле вместо многоточия вводят искомый процент эффекта (в данном случае — 50) (рис. 3).

На вкладке **Design (План)** ставят флажок напротив пункта **Completely randomized** (полностью рандомизированный план) (рис. 4).

На вкладке **Doses (Дозы)** ставят флажок напротив пункта **Explicit notation** (конкретные дозы) (рис. 5).

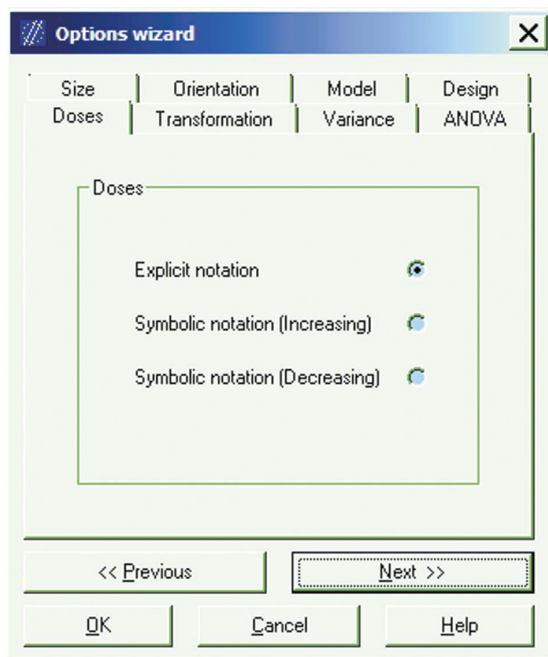


Рис. 5. Вид диалогового окна «Мастер настроек», вкладка «Дозы»

Fig. 5. Options wizard dialog box, Doses tab

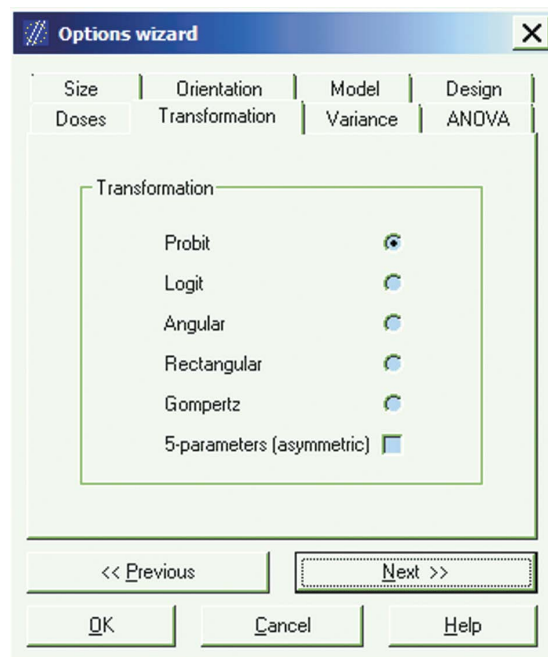


Рис. 6. Вид диалогового окна «Мастер настроек», вкладка «Преобразование»

Fig. 6. Options wizard dialog box, Transformation tab

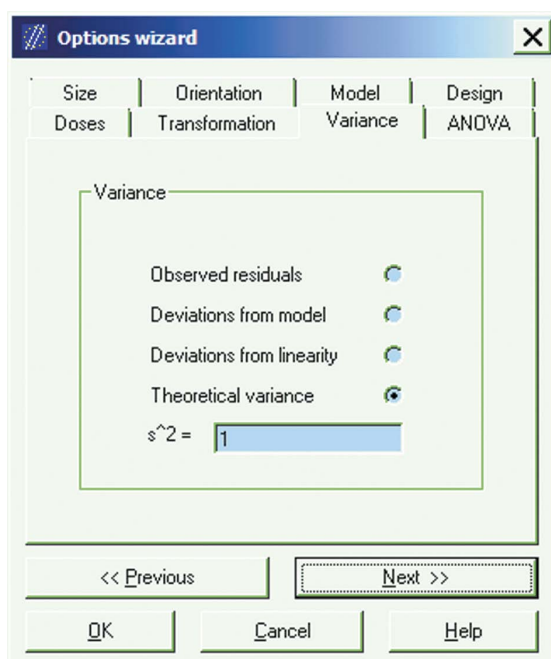


Рис. 7. Вид диалогового окна «Мастер настроек», вкладка «Дисперсия»

Fig. 7. Options wizard dialog box, Variance tab

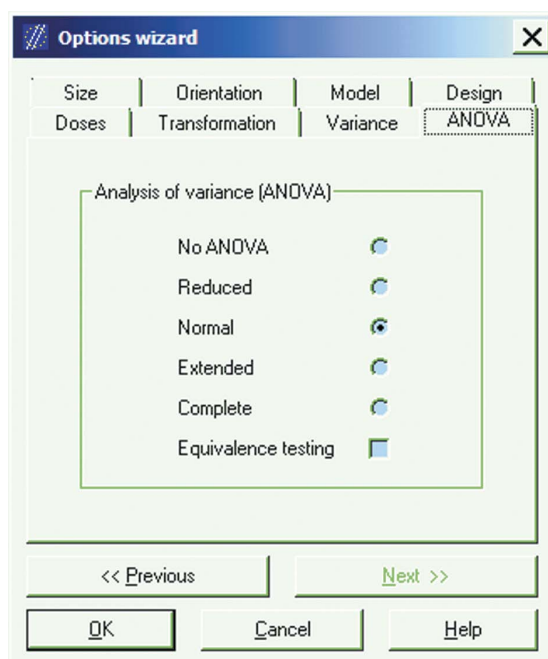


Рис. 8. Вид диалогового окна «Мастер настроек», вкладка «Дисперсионный анализ»

Fig. 8. Options wizard dialog box, ANOVA tab

На вкладке **Transformation (Преобразование)** ставят флажок напротив пункта **Probit** (рис. 6).

На вкладке **Variance (Дисперсия)** ставят флажок напротив пункта **Theoretical variance**. В поле $s^2 =$ вводят значение 1 (теоретическая дисперсия равна 1) (рис. 7).

На вкладке **ANOVA (Дисперсионный анализ)** ставят флажок напротив пункта **Normal** (обычный дисперсионный анализ) (рис. 8).

После заполнения всех вкладок нажимают кнопку **OK** внизу диалогового окна **Options wizard** и сохраняют созданный шаблон под нужным названием, например ЛД50.

Полученный шаблон имеет следующий вид (рис. 9), строки **Model**, **Design**, **Transformation** и **Theoretical variance** отражают выбранные настройки. В левом верхнем углу шаблона находится

amb⁵lat⁵ Version 6.0. Tuesday, 22 September 2020, 11:54:01 [+03:00]. Page 1 of 1



Substance	
Date of assay	

Remarks:

Sample 1	
Ass. pot.	? mg/kg
Doses	(1)

Model: Determination ED50

Design: Completely randomised

Transformation: $y^i = \text{probit}(y)$

Theoretical variance: 1

Executed by:

Calculated by:

Approved by:

Рис. 9. Шаблон «ЛД50»

Fig. 9. LD50 template

таблица, в которую вводят название испытуемого соединения (лекарственного средства) и дату испытания.

Таблица **Remarks** предназначена для дополнительной информации. Данную таблицу можно не заполнять. Таблицу **Sample 1** заполняют полученными результатами биологического испытания. В графу **Doses** вводят дозы, использованные в испытании, а в графу **(1)** — полученные результаты в виде дроби, левая часть которой означает число погибших животных, а правая — общее число животных в данной группе.

ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ДОЗ И ВЫПОЛНЕНИЕ РАСЧЕТОВ

Выполнение расчетов проведено на примере определения ЛД₅₀ змеиногo яда на белых мышax; дозы выражены в виде простых дробей (в долях от максимальной дозы), согласно модели «Quantal responses — Все или ничего».

Для открытия заранее созданного шаблона нажимают кнопку **Library of templates (Библиотека шаблонов)**. В открывшемся одноименном окне выбирают и открывают шаблон **ЛД50** (рис. 9).

В строку **Substance** вводят наименование испытуемого препарата, а в строку **Date of assay** — дату испытания. В таблицу **Sample 1** вводят исходные данные.

Число строк в таблице **Sample 1** соответствует числу доз, используемых в каждом конкретном случае для вычисления искомой величины. При необходимости их можно изменять следующим образом: нажать кнопку **Wizard** и в открывшемся окне **Options wizard** (рис. 1) на вкладке **Size** в поле **Number of doses** ввести необходимое число доз, нажать кнопку **OK**. Предварительно следует убедиться, что все настройки введены правильно (строки под таблицей **Sample 1** на рисунке 9).

Результаты биологического испытания, проведенного в лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, представлены в таблице 1.

Расчет доз в долях от максимальной дозы, принятой за единицу и обозначаемой как 1/1, проводят путем составления пропорции:

если $4 \text{ мг/кг} = 1$,
 $1 \text{ мг/кг} = x$,
 то $x = (1 \times 1) / 4 = 1/4$.

В столбец **Doses** вводят рассчитанные дозы в долях от единицы, а в столбец **(1)** — число погибших животных в виде 0/6, 1/6 и т.д. (рис. 10), нажимают кнопку **Calculate**.

Результаты расчетов выводятся на экран в представленном на рисунке 11 виде.

Результаты дисперсионного анализа демонстрируют высокую статистическую значимость дозозависимости с доверительной вероятностью $P = 0,99$ (строка **Regression** на рисунке 11). Значение P обозначается в программе «звездочками»: (*) — 0,95; (**) — 0,99; (***) — 0,999. Величина в строке **Non-linearity** подтверждает отсутствие значимой нелинейности

Таблица 1. Результаты биологического испытания

Table 1. Bioassay results

Доза змеиного яда, мг/кг Snake venom dose, mg/kg	Число погибших животных Number of animals found dead	Число животных в группе Number of animals in the group	Количество погибших животных, % Number of animals found dead, %
1,0	0	6	0
2,0	1	6	16,7
2,5	4	6	66,7
3,0	5	6	83,3
4,0	6	6	100

comStat Version 6.0. Tuesday, 22 September 2020, 12:15:23 [+03:00]. Page 1 of 1

Substance	Яд гадюки сухой сер.1	Remarks:
Date of assay	17.02.2012	



Sample 1	
Ass. pot.	? mg/kg
Doses	(1)
1/4	0/6
1/2	1/6
5/8	4/6
3/4	5/6
1/1	6/6

Model: Determination ED50
Design: Completely randomised
Transformation: $y' = \text{probit}(y)$
Theoretical variance: 1

Common slope(factor) = 5.03821 (1.86972 to 8.20670)
Correlation | r | : 0.980160 (Weighted)

Рис. 10. Шаблон «ЛД50» с введенными результатами биологического испытания

Fig. 10. Completed LD50 template

comStat Version 6.0. Tuesday, 22 September 2020, 12:16:33 [+03:00]. Page 1 of 1

Substance	Яд гадюки сухой сер.1	Remarks:
Date of assay	17.02.2012	



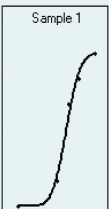
Sample 1	
Ass. pot.	? mg/kg
Doses	(1)
1/4	0/6
1/2	1/6
5/8	4/6
3/4	5/6
1/1	6/6

Model: Determination ED50
Design: Completely randomised
Transformation: $y' = \text{probit}(y)$
Theoretical variance: 1

Common slope(factor) = 5.03821 (1.86972 to 8.20670)
Correlation | r | : 0.980160 (Weighted)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	Chi-square	Probability
Regression	1	6.84072	6.84072	6.84072	0.009 (**)
Non-linearity	3	0.279736	0.0932453	0.279736	0.964
Treatments	4	7.12046	1.78012	7.12046	0.130
Theoretical variance			1.00000		
Total	4	7.12046	1.78012		

Sample 1			
(mg/kg)	Lower limit	Estimate	Upper limit
ED50/kg	1.43513	1.68001	2.15844
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	85.4%	100.0%	128.5%



Sample 1

Рис. 11. Результаты расчетов, используемые для дальнейшего вычисления ЛД₅₀

Fig. 11. Calculation results used for LD₅₀ calculation

(«звездочки» отсутствуют). Следовательно, результаты в нижней таблице (рис. 11) следует признать достоверными.

В строке **ED50/kg** (рис. 11) отображены величины, показывающие, во сколько раз значение средней эффективной дозы или ее доверительные границы меньше максимальной дозы. Поэтому

для вычисления ЛД₅₀ необходимо значение максимальной дозы 4,0 мкг/кг разделить на число в соответствующей ячейке данной таблицы:

- значение ЛД₅₀ составляет 4,0 мг/кг : 1,68 = 2,38 мг/кг,
- нижняя доверительная граница — 4,0 мг/кг : 2,16 = 1,85 мг/кг ($P = 0,95$),

- верхняя доверительная граница — 4,0 мг/кг : 1,44 = 2,80 мг/кг ($P = 0,95$).

Для того чтобы вычислить LD_{10} (минимальную смертельную дозу), необходимо в соответствующее поле на вкладке **Model** диалогового окна **Options wizard** (рис. 3) ввести значение «10», пересчитать результаты, нажав кнопку **Calculate**, и провести преобразование результатов расчетов из относительных единиц в единицы массы (мг/кг), как указано выше.

Сравнение результатов, полученных в рутинных случаях при вычислении LD_{50} и LD_{10} с помощью CombiStats, со значением LD_{50} , рассчитанным с помощью метода, описанного в ОФС.1.1.0014.15 и реализованного с помощью электронных таблиц без преобразования доз, подтверждает правомерность предлагаемого способа выражения доз и указывает на отсутствие статистически значимых различий. В таблице 2 представлены итоги вычислений LD_{50} и LD_{10} на основании результатов биологического испытания, изложенных в таблице 1.

На практике иногда встречаются случаи, когда предпочтительнее использование CombiStats. В таблицах 3 и 4 продемонстрирован один из них, когда использование фармакопейного метода не позволяет правильно вычислить значение LD_{10} .

Показано, что в данном случае значения LD_{50} , вычисленные как фармакопейным методом, так и при помощи CombiStats, практически одинаковы. При этом значение LD_{10} , вычисленное с помощью электронных таблиц, оказалось ниже минимальной дозы, использованной в испытании, и, следовательно, неверно. В то же время с помощью CombiStats было получено правильное значение LD_{10} (с доверительными границами), находящееся в интервале, в котором смертность животных составляет 0–40%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен алгоритм использования программы CombiStats для вычисления LD_{50} и LD_{10} лекарственных средств (модель «Определение средней эффективной дозы», пробит-анализ). Для этого необходимо провести преобразование доз, введенных тест-объектам, в простые дроби (в долях от максимальной дозы, принятой за единицу).

Следует отметить, что CombiStats всегда вычисляет доверительные границы, что позволяет, при необходимости, сравнивать значения не только LD_{50} , но и LD_{10} . В отдельных сложных случаях использование CombiStats позволяет правильно вычислить значения LD_{10} , когда это невозможно с помощью способа, изложенного в фармакопее.

Таблица 2. Значения LD_{50} и LD_{10} змеиного яда, рассчитанные двумя способами

Table 2. Snake venom LD_{50} and LD_{10} calculated in two ways

Наименование показателя Parameter	Результаты вычислений согласно ОФС.1.1.0014.15 (электронные таблицы) Calculation results obtained according to general monograph OFS.1.1.0014.15 (electronic spreadsheets)	Результаты вычислений с помощью CombiStats Calculation results obtained using CombiStats
LD_{50} , мг/кг LD_{50} , mg/kg	2,40	2,38
Нижняя доверительная граница ($P = 0,95$), мг/кг Lower confidence limit ($P = 0.95$), mg/kg	1,86	1,85
Верхняя доверительная граница ($P = 0,95$), мг/кг Upper confidence limit ($P = 0.95$), mg/kg	2,94	2,80
LD_{10} , мг/кг LD_{10} , mg/kg	1,41	1,85
Нижняя доверительная граница ($P = 0,95$), мг/кг Lower confidence limit ($P = 0.95$), mg/kg	—	0,75
Верхняя доверительная граница ($P = 0,95$), мг/кг Upper confidence limit ($P = 0.95$), mg/kg	—	2,17

Примечание. P — доверительная вероятность; «—» — данные отсутствуют.
Note. P —confidence probability; — no data available.

Таблица 3. Результаты испытания лекарственного препарата

Table 3. Bioassay results for the medicinal product

Доза препарата, мкг/кг Medicinal product dose, µg/kg	Число погибших животных Number of animals found dead	Число животных в группе Number of animals in the group	Количество погибших животных, % Number of animals found dead, %
5000	0	10	0
10 000	4	10	40
15 000	4	10	40
20 000	6	10	60
25 000	10	10	100

Таблица 4. Значения LD_{50} и LD_{10} лекарственного препарата, рассчитанные двумя способами

Table 4. Medicinal product LD_{50} and LD_{10} calculated in two ways

Наименование показателя Parameter	Результаты вычислений согласно ОФС.1.1.0014.15 (электронные таблицы) Calculation results obtained according to general monograph OFS.1.1.0014.15 (electronic spreadsheets)	Результаты вычислений с помощью CombiStats Calculation results obtained using CombiStats
LD_{50} , мкг/кг LD_{50} , µg/kg	15 606,70	14 268,10
Нижняя доверительная граница ($P = 0,95$), мкг/кг Lower confidence limit ($P = 0.95$), µg/kg	11 181,97	10 902,80
Верхняя доверительная граница ($P = 0,95$), мкг/кг Upper confidence limit ($P = 0.95$), µg/kg	20 031,36	17 923,10
LD_{10} , мкг/кг LD_{10} , µg/kg	4899,19	7445,33
Нижняя доверительная граница ($P = 0,95$), мкг/кг Lower confidence limit ($P = 0.95$), µg/kg	—	3348,73
Верхняя доверительная граница ($P = 0,95$), мкг/кг Upper confidence limit ($P = 0.95$), µg/kg	—	10 025,60

Примечание. P — доверительная вероятность; «—» — данные отсутствуют.
Note. P —confidence probability; — no data available.

Вклад авторов. П. В. Шадрин — обоснование концепции исследования, проведение вычислений и сравнительного анализа результатов, анализ и обобщение данных литературы, написание текста, работа с графическим материалом и оформление текста; Т. А. Батуашвили — редактирование и критический пересмотр содержания текста; Л. В. Симутенко — планирование работы, обсуждение формулировок; Н. П. Неугодова — идея, консультация, утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Authors' contributions. Pavel V. Shadrin—substantiation of the study concept, carrying out calculations, comparative analysis, analysis and synthesis of literature data, writing of the text, preparation of graphic material, formatting of the text; Tamara A. Batushvili—editing and revision of the contents; Ludmila V. Simutenko—planning of the study, discussion of the text; Natalia P. Neugodova—elaboration of the study idea, providing consultations, approval of the final version of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

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

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bliss CI, McKellen C. Biological assay. *Ann Rev Physiol.* 1943;5:479–539. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.05.030143.002403>
- Burn JH, Finney DJ, Goodwin LG. *Biological standardization*. 2nd edition. New York: Oxford University Press; 1950.
- Бабич ПН, Чубенко АВ, Лапач СН. Применение пробит-анализа в токсикологии и фармакологии с использованием программы Microsoft Excel для оценки фармакологической активности при альтернативной форме учета реакций. *Современные проблемы токсикологии.* 2003;(4):80–8. [Babich PN, Chubenko AV, Lapach SN. Application of the probit-analysis in toxicology and pharmacology using Microsoft Excel program for the estimation of pharmacological activity in an alternative form of reactions registration. *Sovremennye problemy toksikologii = Modern Problems of Toxicology.* 2003;(4):80–8 (In Russ.)]
- Беленький МЛ. *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*. Л.: Медгиз; 1963. [Belen'kiy ML. *Elements of a quantitative evaluation of the pharmacological effect*. Leningrad: Medgiz; 1963 (In Russ.)]
- Прозоровский ВБ. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований. *Психофармакология и биологическая наркология.* 2007;7(3–4):2090–120. [Prozorovskiy VB. Statistical processing of data of pharmacological investigations. *Psikhofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya = Psychopharmacology and Biological Narcology.* 2007;7(3–4):2090–120 (In Russ.)]
- Урбах ВЮ. *Биометрические методы: статистическая обработка опытных данных в биологии, сельском хозяйстве и медицине*. М.: Наука; 1964. [Urbakh VYu. *Biometric methods: statistical processing of experimental data in biology, agriculture and medicine*. Moscow: Nauka; 1964 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Шадрин Павел Валерьевич. Pavel V. Shadrin. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7143-8227>

Батуашвили Тамара Ариеловна, канд. биол. наук. Tamara A. Batushvili, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-2656-8131>

Симутенко Людмила Васильевна, канд. биол. наук. Ludmila V. Simutenko, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-2373-8756>

Неугодова Наталия Петровна, канд. биол. наук. Natalia P. Neugodova, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>

Статья поступила 07.10.2020

После доработки 19.03.2021

Принята к печати 31.05.2021

Article was received 7 October 2020

Revised 19 March 2021

Accepted for publication 31 May 2021



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

Подписной индекс издания:

- с любого номера в региональных агентствах подписки
Урал-Пресс (www.ural-press.ru) — 57942
- по объединенному каталогу
«Пресса России» (www.pressa-rf.ru) — Т57942

