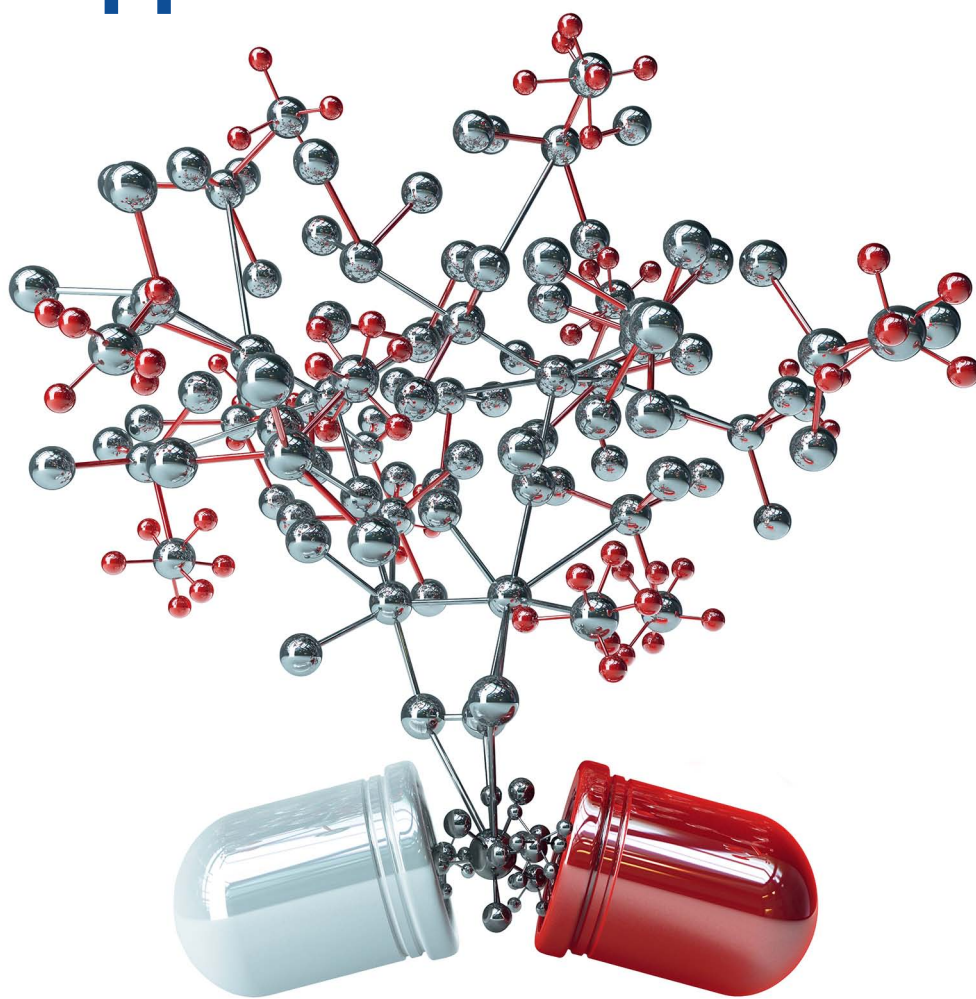


Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств



ГЛАВНАЯ ТЕМА

Доклинические исследования безопасности:
программы, методы, подходы

QR-гид: документы в мгновенном доступе

Нормативные правовые акты, регулирующие доклинические исследования лекарственных средств



Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (ред. от 19.12.2022)



Приказ Минздрава России от 24.08.2017 № 558н «Об утверждении Правил проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения и особенности экспертизы отдельных видов лекарственных препаратов для медицинского применения (референтных лекарственных препаратов, воспроизведенных лекарственных препаратов, биологических лекарственных препаратов, биоаналоговых (биоподобных) лекарственных препаратов (биоаналогов), гомеопатических лекарственных препаратов, лекарственных растительных препаратов, комбинаций лекарственных препаратов), форм заключений комиссии экспертов»

Нормативные документы ЕАЭС*



Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» (ред. от 23.09.2022)



Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств»



Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов»



Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза»



Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 22.12.2020 № 33 «О Руководстве по изучению токсикокинетики и оценке системного воздействия в токсикологических исследованиях лекарственных препаратов»



Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 27.10.2020 № 18 «О Руководстве по исследованию фармакологической безопасности лекарственных препаратов для медицинского применения»



Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 02.09.2019 № 25 «О Руководстве по доклинической и клинической разработке комбинированных лекарственных препаратов»



Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 06.08.2019 № 23 «О Руководстве по оценке и контролю ДНК-реактивных (мутагенных) примесей в лекарственных средствах и установлению границ потенциального канцерогенного риска»



Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 21.05.2020 № 10 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения»

Расширенный перечень нормативных документов в области регулирования экспертизы и регистрации лекарственных средств представлен на сайте ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России <https://www.regmed.ru/activity/normativnye-pravovye-akty-ls/>



* Примечание. Решения ЕЭК носят нормативно-правовой характер и обязательны для государств – членов Евразийского Союза, т.е. являются частью права ЕАЭС и подлежат непосредственному применению в государствах – членах Союза.



Уважаемые коллеги!

В номере журнала, посвященном доклиническим исследованиям, публикуются оригинальные и обзорные статьи, отражающие общие и специфические подходы к исследованиям лекарственных средств.

Данные доклинических исследований составляют основу первичной характеристики механизма действия, потенциальных фармакологических, фармакокинетических и токсикологических свойств препарата и являются предметом тщательной экспертной

оценки при определении отношения ожидаемой пользы к возможному риску при его применении.

В настоящее время при проведении доклинических исследований необходимо следовать принципам 3R (Replacement – замена; Refinement – улучшение; Reduction – сокращение), что требует строгого соблюдения этических норм при проведении экспериментов на животных, предусматривает использование валидированных методов *in vitro* и методов прогнозирования *in silico* для замены или исключения отдельных исследований на животных.

На современном этапе разработка биотехнологических и таргетных средств требует новых методологических подходов к доклиническим исследованиям.

На последующих этапах обращения лекарственных средств доклинические исследования могут рассматриваться как эффективный инструмент углубленного изучения лекарственных препаратов по расширению показаний, изменению режима дозирования и способов применения, разработке лекарственных комбинаций и, при необходимости, переоценки безопасности лекарственного средства и др.

Таким образом, доклинические исследования являются важнейшим этапом разработки нового лекарственного средства и, как правило, служат основанием для принятия ответственного решения о целесообразности и безопасности его первого применения у человека.

Искренне ваша,
главный редактор

**Косенко
Валентина Владимировна**

Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств

Рецензируемый научно-практический журнал

Учредитель и издатель:

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Главный редактор:

Косенко Валентина Владимировна,
канд. фарм. наук

Шеф-редактор:

Федотова Ольга Федоровна
тел.: +7 (495) 121-06-00 (доб. 63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

Ответственный редактор:

Гойкалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, доц.

Ответственные редакторы тематического выпуска:

Енгальцева Галина Нинелевна, канд. биол. наук
Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук

Научные редакторы:

Молчан Нина Валерьевна, канд. фарм. наук
Хрущева Мария Леонидовна, канд. хим. наук

Редактор:

Калиничев Сергей Анатольевич, канд. фарм. наук

Редактор перевода:

Балтина Любовь Александровна

Адрес учредителя и редакции:

127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2
тел.: +7 (499) 190-18-18
(доб. 63-41, 63-65)
vedomosti@expmed.ru

www.vedomostincesmp.ru

Журнал основан в 2005 году.

Выходит ежеквартально (четыре выпуска в год).

Журнал открытого доступа, индексируется в российских и международных реферативных и индексных базах данных:

Chemical Abstracts (CAS), Embase, Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), Russian Science Citation Index (RSCI), его архив включен в базы крупнейших агрегаторов научных ресурсов и библиотек WorldCat, DOAJ, Российская государственная библиотека, Академия Google (Google Scholar), КиберЛенинка, BASE, Dimensions, Open Archives Initiative, ResearchBib, ЭБС ЛАНЬ, Соционет, Research4life, Lens.org, Openaire.eu, Ulrichsweb, Mendeley, Unpaywall, OpenCitations и др.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ – 0,627.

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.

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 медицинским, фармацевтическим и химическим отраслям науки и следующим научным специальностям:

- Промышленная фармация и технология получения лекарств; Фармацевтическая химия, фармакогнозия; Организация фармацевтического дела;
- Фармакология, клиническая фармакология;
- Аналитическая химия.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается
Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International 4.0 CC-BY

Подписано в печать:	20.03.2023
Дата выхода в свет	23.03.2023
Подписной индекс	в каталоге «Пресса России» – 57942, в каталоге агентства «Урал-Пресс» – 57942

© Оформление, составление. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2023

Редакционная коллегия

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

Родин Игорь Александрович, д-р хим. наук, проф., МГУ им. М.В. Ломоносова, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Ответственный секретарь

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

Члены редакционной коллегии

Астапенко Елена Михайловна, канд. техн. наук, Минздрав России (Москва, Россия)

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

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

Гейн Владимир Леонидович, д-р хим. наук, проф., ПГФА (Пермь, Россия)

Глаголев Сергей Владимирович, Минздрав России (Москва, Россия)

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

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

Дмитриев Виктор Александрович, канд. мед. наук, Ассоциация российских фармацевтических производителей (Москва, Россия)

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

Егорова Светлана Николаевна, д-р фарм. наук, проф., Казанский ГМУ (Казань, Россия)

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

Кайтель Сюзан, Ph.D. (Бонн, Германия)

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

Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. 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)

Ремезова Ирина Петровна, д-р фарм. наук, проф., ПМФИ (Пятигорск, Россия)

Рождественский Дмитрий Анатольевич, канд. мед. наук, Департамент технического регулирования и аккредитации ЕЭК (Москва, Россия)

Самылина Ирина Александровна, член-корр. РАН, д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

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

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

Темердашев Азамат Зауалевич, д-р хим. наук, КубГУ (Краснодар, Россия)

Тулегенова Ардак Уринбасаровна, д-р фарм. наук, проф., Фармакопейный комитет ЕАЭС (Москва, Россия)

Хохлов Александр Леонидович, акад. 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)

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)

Регистрация	Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство ПИ № ФС77-82931 от 14 марта 2022 г.
Исполнитель	ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5
Типография	ООО «Издательство «Триада»: 170034, Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 514
Тираж	150 экз. Цена свободная

Regulatory Research and Medicine Evaluation

Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya
Regulyatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv

A peer-reviewed research and practice journal

Founder and publisher:

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

Editor-in-Chief:

Valentina V. Kosenko,
Cand. Sci. (Pharm.)

Managing Editor:

Olga F. Fedotova
tel.: +7 (495) 121-06-00 (ext. 63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

Executive Editor:

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.

Guest Editors for the Special Issue:

Galina N. Engalycheva, Cand. Sci. (Biol.)
Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.)

Science Editor:

Nina V. Molchan, Cand. Sci. (Pharm.)
Maria L. Khrushcheva, Cand. Sci. (Chem.)

Editor:

Sergey A. Kalinichev, Cand. Sci. (Pharm.)

Translation Editor:

Liubov A. Baltina

Postal address of the founder and editorial office:

8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051
tel.: +7 (499) 190-18-18
(ext. 63-41, 63-65);
vedomosti@expmed.ru

Founded in 2005

Published quarterly (four issues per year)

This is an open access journal indexed in Russian and international abstracting and indexing databases: Chemical Abstracts (CAS), Embase, Russian Index of Science Citation (RISC) and Russian Science Citation Index (RSCI), with the archive included in major aggregator databases, such as WorldCat, DOAJ, Russian State Library, Google Scholar, CyberLeninka, BASE, Dimensions, Open Archives Initiative, ResearchBib, Lan' ELS, Socionet, Research4life, Lens.org, Openaire.eu, Ulrichsweb, Mendeley, Unpaywall, OpenCitations, etc.

The journal's two-year impact factor is 0.627.

The journal is included in the official List of peer-reviewed scientific journals which guarantee acknowledgement of the published research by the State Commission that grants Candidate of Science and Doctor of Science degrees.

The journal covers advances in the areas of standardisation and quality control of various groups of medicines, development and improvement of analytical test procedures, approaches to evaluation of medicinal products, including assessment of medicine interchangeability, discusses new sophisticated methods of preclinical and clinical research, relevant issues of pharmacology, clinical medicine, rational use of medicines based on personalised medicine principles.

The journal publishes reviews and original articles, brief communications, guidance materials related to medical and pharmaceutical sciences and the following specialist fields:

- Pharmaceutical formulation and manufacturing; Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy; Pharmaceutical management;
- Pharmacology, clinical pharmacology;
- Analytical chemistry.

The content is licensed under Creative Commons Attribution International CC-BY 4.0.

www.vedomostincesmp.ru

There is no fee for publishing an article and reviewing a manuscript
The content is licensed under Creative Commons Attribution International 4.0 CC-BY

Passed for printing:	20.03.2023
Date of publication:	23.03.2023
Subscription codes	Pressa Rossii catalogue: 57942
	Ural-Press agency catalogue: 57942

© Compilation, design. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 2023

Editorial Board

Editor-in-Chief

Valentina V. Kosenko, Cand. Sci. (Pharm.) (Moscow, Russia)

Deputy Editor-in-Chief

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

Igor A. Rodin, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Lomonosov Moscow State University, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Executive Secretary

Maria L. Khrushcheva, Cand. Sci. (Chem.) (Moscow, Russia)

Editorial Board Members

Elena M. Astapenko, Cand. Sci. (Tech.), Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

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

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

Vladimir L. Gein, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Perm State Pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

Sergey V. Glagolev, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

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

Irina V. Gravel, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Victor A. Dmitriev, Cand. Sci. (Med.), Association of the Russian Pharmaceutical Manufacturers (Moscow, Russia)

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

Svetlana N. Egorova, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Kazan State Medical University (Kazan, Russia)

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

Susanne Keitel, Ph.D. (Bonn, Germany)

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

Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.), Research and Manufacturing Company 'HOME OF PHARMACY' (Leningrad Region, 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)

Irina P. Remezova, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute (Pyatigorsk, Russia)

Dmitry A. Rozhdestvensky, Cand. Sci. (Med.), Department for Technical Regulation and Accreditation of the Eurasian Economic Commission (Moscow, Russia)

Irina A. Samylina, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Dmitry A. Sychev, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Russian Medical Academy of Continuous Professional Education (Moscow, Russia)

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

Azamat Z. Temerdashev, Dr. Sci. (Chem.), Kuban State University (Krasnodar, Russia)

Ardak U. Tulegenova, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Pharmacopoeial Committee of the Eurasian Economic Union

Alexander L. Khokhlov, Academician 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)

Roza I. Yagudina, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

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

Registration	The journal is registered as mass media by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications. Certificate PI No. FS77-82931 dated March 14, 2022
Contract publisher	NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114
Printing office	Triada Publishing House: 9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver 170034
Print run	150 copies. Free price

Содержание

Том 13, №1 2023

ГЛАВНАЯ ТЕМА:		ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ: ПРОГРАММЫ, МЕТОДЫ, ПОДХОДЫ
		АВТОРИТЕТНОЕ МНЕНИЕ
А.Д. Дурнев	8	Лекарственная токсикология занимает важнейшее место в структуре доклинических исследований
		РАЗРАБОТКА ПЕДИАТРИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
Г.Н. Енгальцева, Р.Д. Сюбаев	14	Разработка педиатрических препаратов: ключевые факторы риска и программа доклинических исследований
		ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
К.Л. Крышень, Н.М. Фаустова, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров	27	Эндокринные нарушения при применении лекарственных средств: подходы к доклинической оценке безопасности
О.В. Верле, А.Г. Сиреканян, Н.В. Елисеева, Ю.В. Лифанова, А.А. Спасов, О.В. Островский	42	Влияние нового каппа-агониста (фторфенилпроизводное имидазо[1,2-а]бензимидазола) на геном крыс
		ИССЛЕДОВАНИЯ <i>IN VIVO</i>
А.Ю. Гришина, У.В. Шаркова, Ю.И. Сысоев, Д.Ю. Ивкин, И.А. Никитина, Н.А. Анисимова, В.П. Ильницкий, Е.И. Елецкая, С.В. Оковитый	51	Влияние антагонистов α_2 -адренорецепторов на характеристики электроэнцефалограмм кроликов при введении дексмететомидина
		МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ
Н.М. Фаустова, С.С. Петлицкая, И.Н. Ампилогова, М.В. Карлина, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров	60	Ингибиторы нейраминидазы: разработка и валидация методики определения ингибирующего действия <i>in vitro</i>
А.Н. Афанасьева, В.Б. Сапарова, И.Е. Макаренко, Р.В. Драй, Т. А. Сельменских	77	Опыт проведения валидации <i>in vitro</i> методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы
В.М. Косман, М.В. Карлина, Н.М. Фаустова, Е.А. Ежова, И.Г. Котельникова, В.Г. Макаров, М.Н. Макарова	89	Особенности проведения биоаналитической части исследования эквивалентности биоаналогичного препарата надропарина кальция
Ю.С. Транова, А.В. Шулькин, И.В. Черных, П.Ю. Мыльников, А.А. Слепнев, Е.Н. Якушева	104	Количественный анализ митоксантрона методом ВЭЖХ-МС/МС в среде для культивирования клеток Caco-2
А.М. Агафонов, И.П. Ремезова, В.В. Косенко, Н.Д. Бунятян, Л.С. Аносова, В.А. Евтеев	112	Определение степени ненасыщенности эфирных масел

Contents

Volume 13, No. 1 2023

MAIN TOPIC:		PRECLINICAL SAFETY STUDIES: PROGRAMMES, METHODS, AND APPROACHES
		AUTHORITATIVE OPINION
A.D. Durnev	8	Pharmaceutical Toxicology is the Most Important Component of Preclinical Studies
		DEVELOPMENT OF PAEDIATRIC MEDICINAL PRODUCTS
G.N. Engalycheva, R.D. Syubaev	14	Development of Paediatric Medicines: Key Risk Factors and Non-clinical Research Programmes
		TOXICITY STUDIES
K.L. Kryshen, N.M. Faustova, M.N. Makarova, V.G. Makarov	27	Endocrine Disorders Associated with Medicinal Products: Approaches to Preclinical Safety Assessment
O.V. Verle, A.G. Sirekanyan, N.V. Eliseeva, Yu.V. Lifanova, A.A. Spasov, O.V. Ostrovskij	42	Effects of a New Kappa Agonist (Fluorophenyl Derivative of Imidazo[1,2- <i>a</i>]benzimidazole) on the Rat Genome
		IN VIVO STUDIES
A.Yu. Grishina, U.V. Sharkova, Yu.I. Sysoev, D.Yu. Ivkin, I.A. Nikitina, N.A. Anisimova, V.P. Ilnitskiy, E.I. Eletskaia, S.V. Okovityi	51	Influence of α_2 -Adrenoreceptor Antagonists on Electroencephalogram Characteristics after Dexmedetomidine Administration in Rabbits
		TESTING PROCEDURES
N.M. Faustova, S.S. Petlitskaya, I.N. Ampilogova, M.V. Karlina, M.N. Makarova, V.G. Makarov	60	Neuraminidase Inhibitors: Development and Validation of a Procedure for <i>In Vitro</i> Determination of the Inhibitory Effect
A.N. Afanasyeva, V.B. Saparova, I.E. Makarenko, R.V. Drai, T.A. Selenskikh	77	Experimental Validation of an <i>In Vitro</i> Method for Assessing Insulin-Dependent Glucose Uptake
V.M. Kosman, M.N. Karlina, N.M. Faustova, E.A. Ezhova, I.G. Kotelnikova, V.G. Makarov, M.N. Makarova	89	Considerations for the Bioanalytical Part of Equivalence Studies of Biosimilar Nadroparin Calcium
Yu.S. Tranova, A.V. Shchulkin, I.V. Chernykh, P.Yu. Mylnikov, A.A. Slepnev, E.N. Yakusheva	104	Mitoxantrone Quantification by HPLC-MS/MS in Caco-2 Culture Media
A.M. Agafonov, I.P. Remezova, V.V. Kosenko, N.D. Bunyatyan, L.S. Anosova, V.A. Evteev	112	Determination of the Degree of Unsaturation in Essential Oils



Андрей ДУРНЕВ:
«Лекарственная токсикология
занимает важнейшее место
в структуре доклинических
исследований»

РЕЗЮМЕ

«Не навреди» — основной принцип обеспечения безопасности пациента, таким образом, очевидна оправданная жесткость и требовательность к безопасности лекарственных препаратов, определенная законодательно. Доклиническая оценка безопасности направлена на защиту здоровья человека за счет исключения потенциальных препаратов, прогнозируемый риск клинического применения которых превышает возможную пользу. Токсикология традиционно определяется как «наука о пагубном воздействии химических веществ на живые организмы», а токсикологические исследования являются неотъемлемой частью доклинического изучения новых лекарственных препаратов. О роли токсикологии в доклинических исследованиях рассказывает член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, лауреат Государственной премии Российской Федерации Андрей Дмитриевич ДУРНЕВ — руководитель отдела лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», председатель комиссии Министерства здравоохранения Российской Федерации по аттестации экспертов на право проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения, заместитель председателя Межведомственного совета РАН по научному обоснованию и сопровождению национальной лекарственной политики Российской Федерации.

Ключевые слова: лекарственная токсикология; доклинические исследования; генотоксикологические исследования

Для цитирования: Дурнев А.Д. Лекарственная токсикология занимает важнейшее место в структуре доклинических исследований. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(1):8–13. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-1-8-13>

Andrey D. DURNEV: “Pharmaceutical Toxicology is the Most Important Component of Preclinical Studies”

ABSTRACT

The first principle for ensuring patient safety is to do no harm (*primum non nocere*). It clearly justifies why the legislative requirements for the safety of medicinal products should be strict and meticulous. The aim of preclinical safety evaluation is to protect public health by preventing the clinical use of medicinal products with a potentially unfavourable risk–benefit profile. Traditionally, toxicology is defined as the study of the adverse effects of chemical substances on living organisms. Toxicity studies are integral to preclinical programmes for new medicinal products. The role of toxicology in preclinical studies is explained in this interview by Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, and Full Professor Andrey D. Durnev. Dr. Durnev is a laureate of the State Prize of the Russian Federation. He holds the positions of Head of the Pharmaceutical Toxicology Department of V.V. Zakusov Institute of Pharmacology, Chairman of the Commission of the Ministry of Health of the Russian Federation for the Certification of Experts for the Right to Perform Regulatory Evaluation of Medicinal Products for Human Use, and Deputy Chairman of the Interdepartmental Council of the Russian Academy of Sciences on the Scientific Substantiation and Maintenance of Drug Policy of the Russian Federation.

Key words: pharmaceutical toxicology; preclinical studies; genotoxicity studies

For citation: Durnev A.D. Pharmaceutical toxicology is the most important component of preclinical studies. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):8–13. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-1-8-13>

– Андрей Дмитриевич, вы много лет занимаетесь лекарственной токсикологией, расскажите, каково место лекарственной токсикологии в создании новых лекарств?

Разработка нового инновационного лекарственного средства – длительный и весьма затратный процесс. Велико бывает разочарование исследователей и инвесторов, когда на заключительных этапах создания препарата выявляются эффекты, исключающие или ограничивающие его практическое применение. Отсюда очевидно, что практичнее начинать доклинические токсикологические исследования как можно раньше. В идеале – еще на стадии теоретической проработки идеи с помощью компьютерных моделей. И далее – на всех этапах разработки, поскольку известно, что проявления токсичности *in vivo* могут зависеть не только от структуры и дозы соединения, но также от пути, длительности, режима введения, состава готовой лекарственной формы и многих других переменных. Наилучший результат достигается в тех случаях, когда фармаколог и лекарственный токсиколог работают в тесном контакте с самых ранних стадий разработки, а на заключительном этапе, когда определяется соотношение «польза–риск» применения лекарственного препарата, к ним

присоединяются клинические фармакологи и профильные клинические специалисты.

На каждом этапе разработки направленность и объем доклинических токсикологических исследований существенно различаются и определяются, помимо природы исследуемого соединения и спектра его фармакологической активности, многими другими факторами. Оценка токсичности действующего вещества, фармацевтической субстанции и (или) препарата не может быть сведена к выполнению рутинных тестов и является самостоятельной научной задачей, требующей разработки специальной стратегии и тактики выполнения.

– Когда лекарственная токсикология как отдельная наука была выделена из общей фармакологии и заняла значимое место в сфере регуляторных исследований?

Рассматривая лекарственную токсикологию, уместно упомянуть Парацельса, которому принадлежит знаменитый афоризм: «Одна только доза делает вещь ядовитой». Здесь нет упоминания о лекарстве, но там, где появляется понятие дозы, возникают науки фармакология и лекарственная токсикология! Последняя рассматривается как раздел фармакологии.

Современная лекарственная токсикология сопряжена с регуляторной токсикологией. Между этими направлениями нет существенных методологических различий, они могут восприниматься неразрывно, поскольку посвящены доклинической оценке безопасности лекарственных средств. При строгом подходе можно отметить, что первая более смещена к исследованию и установлению фундаментальных явлений, механизмов и закономерностей проявления токсических эффектов, вторая ориентирована на оценку безопасности конкретных субстанций и препаратов в интересах регулирующих ведомств в соответствии с принятыми нормативами. Таким образом, лекарственную токсикологию можно расценивать как фундаментальную основу регуляторной токсикологии.

Историю лекарственной токсикологии в ее регуляторном аспекте логично отсчитывать с 1938 г., когда в США в законе о продуктах питания, лекарственных веществах и косметических средствах появился пункт, обязывающий проверять их безопасность и эффективность на животных. Появление этого правила было инициировано гибелью в 1937 г. 107 американцев, получивших «Эликсир сульфаниламида», загрязненный диэтиленгликолем.

Особую значимость лекарственная токсикология приобрела после общеизвестной талидомидовой трагедии, к счастью, практически не затронувшей нашу страну. Именно в это время, в 1963 г., решением Министерства здравоохранения СССР было создано Управление по внедрению новых лекарственных средств и медицинской техники. В составе этого управления функционировал Фармакологический комитет, оценивающий безопасность и эффективность лекарственных средств. В состав Фармакологического комитета и приданных ему экспертных комиссий входили ведущие токсикологи, трудами которых была сформирована современная отечественная лекарственная и регуляторная токсикология. Уместно привести имена членов-корреспондентов РАН и РАМН Гуськовой Т.А. и Любимова Б.И., профессоров Арзамасцева Е.В., Березовской И.В., Ревазовой Ю.А. и многих других, трудами которых в 2000, 2005 и 2012 гг. были подготовлены и введены в обращение руководства по проведению доклинических токсикологических исследований.

В 1990–1992 гг. функции Фармакологического комитета перешли к вновь созданному учреждению, претерпевшему несколько переименований. Сейчас это ФГБУ «Научный центр

экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

– Каковы тенденции развития современной лекарственной/регуляторной токсикологии, как изменилась эта наука за последние десятилетия?

Исследования, направленные на обеспечение безопасности лекарств, характеризуются консервативным постоянством подходов и методов, но в последние годы существенно модифицируются. Это связано с возникновением различных взглядов и требований к оценке воспроизведенных и гибридных препаратов, инновационных препаратов, в том числе созданных на основе био- и нанотехнологий, радиофармацевтических препаратов, препаратов для генной терапии, а также успехами и неудачами в попытках использования новых биомедицинских подходов и методов исследований.

Существенный сдвиг в области лекарственной токсикологии произошел относительно недавно, на рубеже веков. Токсичность перестали рассматривать как специфическое свойство препарата или иного ксенобиотика, определив ее как круг неблагоприятных последствий специфического взаимодействия между действующим фактором и организмом. Это, незначительное, на первый взгляд, смещение акцента породило много следствий. Среди них такие важные, как учет индивидуальной и межвидовой чувствительности, дифференциация собственно фармакологических и токсических эффектов, повышенное внимание к возможным отдаленным последствиям воздействий, связанных с влиянием на геном и (или) организм во внутриутробном периоде, к выявлению дозовых зависимостей и механизмов реализации токсических эффектов и др.

Успехи медико-биологических наук способствовали стремительному пополнению исследовательского арсенала лекарственных токсикологов: выявление и использование молекулярно-биологических маркеров, визуализация патологических процессов и широкое использование токсикокинетических данных все прочнее занимают позиции в практике оценки безопасности лекарственных средств.

Достижения в разработке нанопрепаратов, средств для генной терапии, биофармацевтических и радиофармацевтических препаратов ставят новые задачи. Их решение не всегда может опираться на опыт, накопленный в области токсикологии малых молекул. Например, при разработке генотерапевтических препаратов важна

оценка инсерционного мутагенеза, нерегулируемой экспрессии трансгена, долговременной персистенции, вертикального переноса генов и пр. Это, с одной стороны, требует модификации стандартных программ исследования безопасности, с другой — еще раз подчеркивает мысль о том, что доклиническое токсикологическое исследование каждой фармакологической субстанции и лекарственного препарата является самостоятельной научной задачей.

Среди новейших инициатив важно отметить программу «Tox21», ключевой концепцией которой является выявление молекулярных и клеточных событий, запускающих пути неблагоприятных исходов, на основе идентификации которых с применением методов *in vitro* и *in silico* будет возможно максимально быстро, дешево и надежно предсказывать возможный вред для здоровья. Значимость подобных подходов для обеспечения безопасности лекарств и их место в лекарственной токсикологии еще предстоит обсудить!

– Какие главные дискуссионные вопросы вы можете выделить в области доклинической оценки безопасности лекарств?

С одной стороны, есть десятилетиями устоявшиеся, проверенные регуляторные правила оценки безопасности лекарственных препаратов, с другой — большое количество разной степени обоснованности новаций. Многие из них не имеют научного наполнения, а касаются административно-организационной и этической составляющих.

Оживленно обсуждается вопрос о замене исследований на животных на так называемые «альтернативные методы». В декабре 2022 г. в сенате США был рассмотрен и принят закон «Альтернативы тестированию на животных для целей применения лекарственных средств и биологических продуктов», расцененный многими как повод для отказа от использования животных при исследованиях безопасности лекарственных средств [1]. Примечательно, что дискуссия об использовании животных в экспериментах продолжается с позапрошлого века. В руководстве по фармакологии, выпущенном в Санкт-Петербурге в 1884 г., отмечается: «...или придется экспериментировать на самом человеке, или же пожертвовать животным для человека»¹. Я однозначно разделяю позицию исследователей, которые выступают за использование животных и утверждают, что «...неживотные

технологии все еще «в зачаточном состоянии» и не смогут заменить модели на животных в течение многих, многих лет» [1].

Как нечто новое часто подается и обсуждается идея 3R, выдвинутая в 1959 г. [2], предполагающая замену, сохранение и улучшение использования и содержания животных. Главный и полностью разделяемый мной посыл этой инициативы — гуманное отношение к животным и минимизация их страданий. Как большой успех наших научных организаций следует приветствовать создание и функционирование биоэтических комиссий, рассматривающих научную и этическую обоснованность экспериментов на животных.

Наконец, остается актуальным внедрение надлежащей лабораторной практики (GLP). Она не имеет научной составляющей и является технологией, обеспечивающей качество научного процесса, то есть достоверность, воспроизводимость и прогностическую значимость экспериментальных данных. GLP предъявляет высокие требования к материально-техническому оснащению и кадрам, требует перестройки уже имеющихся систем обеспечения качества. Зачастую наблюдается парадоксальная ситуация: коллективы, имеющие вновь созданную материальную базу, удовлетворяющую требованиям GLP, не имеют достаточного опыта для проведения всего комплекса доклинических токсикологических исследований, а сложившиеся и устоявшиеся коллективы академических учреждений, имеющие необходимый опыт, не располагают материально-технической базой для полномасштабного внедрения GLP.

Что касается сугубо научных проблем, то их много, не получится осветить все в одном интервью. Пунктирно коснусь трех, наиболее общих, в каком-то смысле извечных проблем оценки острой и хронической токсичности и специфических видов токсичности лекарственных препаратов.

Первая проблема — экстраполяция результатов исследований с экспериментальных животных на человека. Ее осложняют много факторов, прокомментирую два. Первый — межвидовая чувствительность, различия в которой, например, для 2,3,7,8-тетрахлордибензодиоксина по показателям LD достигают сотен раз [3, 4]. Второй — проявления токсичности в зависимости от состояния организма. Стандартные исследования проводятся на здоровых молодых

¹ Нотнагель Г., Россбахъ М.И. Дополнение къ четвертому изданію Руководства къ фармакологіи. Составлено по пятому немецкому изданію д-ромъ Вилижанинымъ. СПб.: изданіе журнала «Медицинская Библиотека»; 1884.

животных, тогда как до 50% препаратов назначаются пациентам старшей возрастной группы, обремененным комплексом различных заболеваний. Отсюда для оценки безопасности многих лекарств, во-первых, необходимо применение биомodelей заболеваний, во-вторых, учет фактора возраста, например при исследовании препаратов для педиатрической или гериатрической практик.

Вторая проблема — экстраполяция доз. Соотношение эффективных и токсических доз между человеком и животными остается *terra incognita*. Нет общепринятых алгоритмов переноса, каждый известный алгоритм уязвим для критики. Возможно, большая ясность в этом вопросе наступит при более широком привлечении токсикокинетики в сферу рутинных исследований и дифференциации подходов относительно препаратов разных фармакологических групп.

Третья проблема — «стандартизованность» исследований. С моей точки зрения, недопустимо исследование безопасности различных по природе и фармакологической активности соединений или их комплексов по стандартным, усредненным протоколам. Исследование каждого фармакологического вещества, каждой готовой лекарственной формы должно являться самостоятельной научной задачей, которая может быть успешно решена только в сотрудничестве фармаколога-разработчика и токсиколога. Исходя из этого, непривлекательной выглядит идея создания специализированных центров доклинических токсикологических исследований, работающих в отрыве от разработчиков лекарственных средств.

– Андрей Дмитриевич, как, по вашему мнению, будет развиваться наука токсикология в ближайшие десятилетия?

Прежде всего думаю, что здравый смысл возобладает и исследования с использованием животных останутся преобладающими в оценке безопасности лекарств. Вместе с этим очевидно, что в области доклинических токсикологических исследований биофармацевтических препаратов определенный вес приобретут исследования *in vitro* с хорошо доказанной и научно обоснованной прогностической значимостью, а на ранних этапах разработки лекарственных средств в прогностических целях широко будут применяться методы *in silico*. Очевидна необходимость в уточнении и пересмотре многих действующих протоколов токсических исследований на основе вновь получаемых данных и (или) в отношении отдельных групп пре-

паратов, например радиофармацевтических препаратов или нанопроизводных и др.

Как глобальная тенденция продолжится тренд от оценки токсичности препарата к оценке безопасности его применения. Больше внимание будет уделяться факторам, модифицирующим токсические эффекты и, в конечном счете, определяющим индивидуальную и (или) групповую (нозологическую) чувствительность человека к токсическим воздействиям. Все большее внимание будет уделяться минимизации затрат и времени при максимизации информации о безопасности применения лекарственного средства. Например, уже сегодня получены убедительные доказательства того, что двух-трехлетняя оценка канцерогенности препарата с высокой надежностью может быть заменена набором краткосрочных тестов на генотоксичность и клеточную трансформацию *in vitro*, и мы на пороге отказа от длительных исследований на канцерогенность.

Очевидны многие локальные изменения в практике доклинической оценки безопасности, например внедрение биомodelей, расширение токсикокинетических исследований, уже упомянутые визуализация и применение биомаркеров, в том числе позволяющих не только констатировать патологические изменения, но также прижизненно отслеживать их динамику. Предполагаю, что произойдет расширение спектра конечных точек, по которым проводится оценка токсичности. Тактика и стратегия доклинического исследования все больше будут ориентированы на повышение предиктивной ценности доклинических тестов, все глубже будет проводиться дифференциация объема исследований и выбора тестов с учетом природы препаратов разных фармакологических групп и специфики клинического применения лекарств. Например, уже очевидно, что оценку эмбриотоксичности, тератогенности и фетотоксичности лекарственных средств, предназначенных для беременных, следует выполнять не на одном, а на двух видах животных. Все чаще оценивается фотобезопасность лекарств и формирование под их влиянием лекарственной зависимости.

Внедрение новых методов в область токсикологии прямо зависит от фундаментальных и методологических успехов медико-биологических наук. На их основе лекарственная и связанная с ней регуляторная токсикология будут развиваться и совершенствоваться вместе с развивающейся наукой, поскольку безопасность

применения — важная характеристика современных лекарственных средств.

– В 2022 году опубликована ваша монография «Генетическая токсикология» в соавторстве с А.К. Жанатаевым и Н.В. Ереминой, посвященная современным генотоксикологическим исследованиям. Каковы основные тенденции развития этой науки?

Генетическая токсикология — раздел по изучению влияния химических веществ на генетические структуры половых и соматических клеток. Генотоксические поражения инициируют и (или) сопровождают наследственные, онкологические, сердечно-сосудистые заболевания, нарушения репродуктивной функции, сахарный диабет и другие заболевания. Принципиально, что патологическая манифестация генотоксичности отсрочена на годы, десятилетия и даже поколения, то есть не может быть выявлена в ходе оценки острой и хронической токсичности. Поэтому тестирование на генотоксичность выделено в отдельный вид специфических видов токсичности и имеет свою методологию, опирающуюся на инструментальные генетические и молекулярно-генетические методы.

На переломе веков в доклиническую практику вошли комплексные программы, позволяющие всесторонне оценивать генотоксический потенциал ксенобиотиков, а проверка на мутагенность (генотоксичность) стала обязательной процедурой во всех странах с развитой регуляторной системой. Обнаружение генотоксической активности в подавляющем большинстве случаев означает прекращение разработки препарата, что определяет необходимость как можно более раннего проведения таких исследований.

Сегодня продолжают обширные работы по исследованию механизмов и закономерностей мутагенеза в различных типах клеток, совершенствованию имеющихся и разработке новых методов выявления генотоксических эффектов, оценке риска генотоксических воздействий, мониторингу биомаркеров генотоксичности, особенностям проведения исследований для лекарственных препаратов разных групп и многим другим направлениям, совокупность которых рассматривается в монографии. Помимо этого, большое внимание уделяется вопросам фармакологической и нутрициологической защиты генома, а следовательно, профилактике болезней, обусловленных генотоксическими поражениями.

– Андрей Дмитриевич, ощущается ли санкционное давление на работу российских фармакологов и токсикологов?

Это очень многогранный вопрос. Если коротко, то в плане материально-технического снабжения ощущается заметно, хотя положение стабилизируется и выправляется, но на новом уровне финансовых затрат. В отношении научного и экспертного процесса все более оптимистично. Россия относится к странам с развитой системой регистрации и обращения лекарственных средств, располагает серьезным кадровым и научным потенциалом. Беспокойство вызывает сложившаяся тенденция к копированию зарубежных образцов в области обеспечения безопасности лекарств, их превалирование над отечественными традициями и разработками. Санкции стимулируют переоценку подобного подхода и дают возможность реализовать и внедрять передовые идеи отечественных специалистов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wadman M. FDA no longer has to require animal testing for new drugs. *Science*. 2023;379(6628):127–8. <https://doi.org/10.1126/science.adg6276>
2. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen & Co; 1959. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x>
3. Pohjanvirta R, Tuomisto J. Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacol Rev*. 1994;46(4):483–549. PMID: 7899475.
4. Hruska RE, Olson JR. Species differences in estrogen receptors and in the response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure. *Toxicol Lett*. 1989;48(3):289–99. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(89\)90056-8](https://doi.org/10.1016/0378-4274(89)90056-8)



Г.Н. Енгальчева ✉ 
Р.Д. Сюбаев 

Разработка педиатрических препаратов: ключевые факторы риска и программа доклинических исследований

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

✉ Енгальчева Галина Нинелевна; Engalychева@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Отсутствие в достаточном количестве зарегистрированных лекарственных средств для педиатрической популяции является общемировой проблемой. Поскольку дети являются пациентами, входящими в группы повышенного риска, при разработке лекарственных препаратов для педиатрии необходимо заранее оценить и максимально минимизировать неоправданные риски.

Цель работы — анализ действующей нормативно-правовой и методической базы доклинических исследований и выделение ключевых факторов риска для обоснования безопасности педиатрических пациентов при разработке препаратов, предназначенных для детей.

Одна из основных задач доклинической оценки безопасности препаратов, предназначенных для применения в педиатрии, состоит в выявлении нежелательного воздействия на процессы роста и развития организма. Согласно методическим руководствам национального и международного статуса, данные по безопасности, полученные в ходе клинических исследований с участием взрослых, представляют наиболее ценную информацию для решения вопроса о безопасности включения педиатрических пациентов в клинические испытания. Вопрос о проведении доклинических исследований с использованием неполовозрелых (ювенильных) животных рассматривается в тех случаях, когда имеющиеся данные по безопасности, полученные из экспериментов на половозрелых животных и у взрослых пациентов в клинических исследованиях, признаются недостаточными для оценки безопасности клинических испытаний с участием детей. Программа доклинических исследований педиатрических препаратов разрабатывается на основании комплексной оценки ключевых факторов риска в каждом конкретном случае с использованием анализа весомости доказательств (WoE). Вывод о безопасности применения лекарственного препарата у детей должен базироваться на оценке риска в релевантных клинических и доклинических исследованиях.

Ключевые слова: лекарственные средства; доклинические исследования; педиатрия; ключевые факторы риска; WoE-анализ; ювенильные животные; оценка риска

Для цитирования: Енгальчева Г.Н., Сюбаев Р.Д. Разработка педиатрических препаратов: ключевые факторы риска и программа доклинических исследований. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(1):14–26. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-500>

G.N. Engalycheva ,
R.D. Syubaev 

Development of Paediatric Medicines: Key Risk Factors and Non-clinical Research Programmes

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

✉ Galina N. Engalycheva; Engalycheva@expmed.ru

ABSTRACT

The lack of approved paediatric medicines is a global problem. Since paediatric patients are a high-risk group, a developer of paediatric medicines needs to evaluate and minimise unjustified risks early in the development process.

The aim of the study was to analyse the current regulatory and methodological framework for non-clinical research and identify key risk factors that need addressing in paediatric drug development in order to substantiate the safety of children. One of the main objectives of non-clinical safety assessment of a medicinal product intended for children is to identify undesirable effects on child growth and development. According to national and international methodological guidelines, the developer may obtain the most valuable information to decide whether it is safe to enrol children into a clinical trial from the safety data collected in clinical studies in adult subjects. If the safety data available from studies in mature animals and adult subjects are insufficient to evaluate the safety of the clinical trial for paediatric patients, the developer may consider conducting non-clinical studies in immature (juvenile) animals. A paediatric non-clinical testing programme should be in line with a comprehensive significance assessment of key risk factors carried out on a case-by-case basis using weight-of-evidence (WoE) analysis. The conclusion on the safety of a medicinal product for children should be based on risk assessment in relevant clinical and non-clinical studies.

Key words: medicines; non-clinical studies; paediatrics; key risk factors; WoE analysis; juvenile animals; risk assessment

For citation: Engalycheva G.N., Syubaev R.D. Development of paediatric medicines: key risk factors and non-clinical research programmes. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):14–26. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-500>

Введение

Отсутствие в достаточном количестве зарегистрированных лекарственных средств для педиатрической популяции является общемировой проблемой, поскольку разработка таких препаратов зачастую экономически невыгодна для фармацевтических предприятий и держателей регистрационных удостоверений. Это связано с высокими затратами при неясных перспективах возврата средств в педиатрическом сегменте фармынка, доля которого оценивается примерно в 3% [1]. Для исправления создавшейся ситуации при разработке лекарственных препаратов в странах Европейского союза (ЕС) и США принимаются законодательные акты, правила, требования, которые, с одной стороны, поощряют, с другой — обязывают фармацевтические компании к проведению педиатрических исследований [2]. В Российской Федерации

жесткие регуляторные требования к разработке педиатрических препаратов отсутствуют, несмотря на то, что и в нашей стране существует дефицит лекарственных препаратов для детей. Так, в 2019 г. в Государственном реестре лекарственных средств России было зарегистрировано всего 72 лекарственных средства (из 53,5 тыс.) с указанием «для детей» под 54 торговыми наименованиями, из них только 2 препарата официально разрешены для применения у детей в возрасте до 1 месяца [3].

Поскольку дети являются пациентами, входящими в группы повышенного риска¹, при разработке лекарственных препаратов для педиатрической популяции необходимо максимально минимизировать неоправданные риски. Одна из возможностей решения этой задачи заключается

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

в проведении доклинических исследований безопасности. Однако, как показывает экспертный опыт, отечественные разработчики зачастую формально подходят к доклиническим исследованиям безопасности лекарственных средств для детей, полагая, что сам факт изучения общетоксического действия препарата на неполовозрелых животных является достаточным основанием для включения соответствующей популяции пациентов в инструкцию по медицинскому применению препарата. Иными словами, в досье отсутствуют анализ ключевых факторов риска применения препарата в педиатрической популяции, обоснование целесообразности и дизайна программы доклинических исследований, не представлена научная интерпретация полученных результатов. Вышеизложенное зачастую нивелирует ценность проведенного исследования и означает, что были впустую потрачены материальные средства и экспериментальные животные, т.е. не выполнены принципы 3R (reduce, replace, refine — уменьшить, заменить, улучшить).

Цель работы — анализ действующей нормативно-правовой и методической базы доклинических исследований и выделение ключевых факторов риска для обоснования безопасности педиатрических пациентов при разработке препаратов, предназначенных для детей.

В статье не рассматриваются рекомендации по проведению доклинических исследований на неполовозрелых животных для препаратов генной и клеточной терапии, вакцин, тканевых инженерных продуктов.

Нормативно-правовая и научно-методическая база, регламентирующая доклинические исследования безопасности педиатрических препаратов

Российская Федерация. Согласно действующему законодательству² клиническому исследованию лекарственного препарата с участием детей должны предшествовать клинические исследования на совершеннолетних гражданах, за исключением случаев, когда

исследуемый препарат предназначен исключительно для использования несовершеннолетними гражданами.

Подходы к планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств, в том числе педиатрических, установлены согласно ГОСТ³. Общие принципы планирования доклинических исследований в ходе разработки противоопухолевых лекарственных средств, включая препараты для детей, определяет еще один ГОСТ⁴. Основные научно-методические принципы доклинических исследований при разработке лекарственных средств для детей изложены в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств⁵.

Евразийский экономический союз. В отношении лекарственных препаратов, предназначенных исключительно для применения несовершеннолетними, проводится ускоренная экспертиза лекарственных препаратов⁶. Данное положение призвано ускорить вывод на рынок лекарственных средств для применения в педиатрической практике, но в то же время накладывает особое бремя ответственности за безопасность педиатрических пациентов как на разработчика препарата, так и на экспертную организацию.

В экспертном отчете по оценке результатов доклинических исследований указано на необходимость согласования плана исследования препарата у детей с уполномоченными органами и организациями, осуществляющими экспертизу лекарственных препаратов⁷. Необходимо отметить, что к моменту написания статьи данное положение носило декларативный характер, поскольку отсутствовали регламентирующие документы Евразийского экономического союза (ЕАЭС) по составлению плана исследования препарата у детей и процедуре согласования этого плана с уполномоченными органами.

Единый порядок проведения доклинических исследований безопасности лекарственных препаратов для их последующей регистрации в рамках

² Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

³ ГОСТ Р 56701-2015. Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств.

⁴ ГОСТ Р 57147-2016. Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования противоопухолевых лекарственных средств.

⁵ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

⁶ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

⁷ Там же, Приложение № 13 «Указания по составлению экспертного отчета по оценке результатов доклинических (неклинических) исследований».

ЕАЭС установлен согласно Руководству⁸. В документе отражена взаимосвязь между необходимостью проведения доклинических исследований и проведением клинических исследований, в том числе с участием детей.

Рекомендации по фармацевтической разработке лекарственных препаратов для детей в возрасте от рождения до 18 лет содержатся в соответствующем документе⁹.

Также принята рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии (ЕЭК), которая обобщает имеющуюся информацию о лекарственных формах лекарственных препаратов для детей и содержит примеры использования разрешенных лекарственных форм лекарственных препаратов для детей с учетом разъяснения порядка их изучения лицам, участвующим в разработке и изготовлении лекарственных препаратов, в улучшении доступности подходящих лекарственных форм лекарственных препаратов для детей¹⁰.

Международный совет по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH). В ЕС с целью стимулирования разработки лекарственных средств для детей в возрасте от 0 до 17 лет и содействия их скорейшему внедрению в медицинскую практику с 26 января 2007 г. вступили в силу два документа:

- постановление № 1901/2006 Европейского парламента и Совета ЕС от 12 декабря 2006 г. о лекарственных средствах для использования в педиатрии¹¹;
- поправка № 1902/2006 к постановлению № 1901/2006, в которую внесены изменения, касающиеся процедур принятия решений для Европейской комиссии¹².

Эти акты кардинально изменили нормативное регулирование при разработке педиатрических

лекарственных средств в Европе. Был сформирован Педиатрический комитет (Paediatric Committee, PDCO)¹³, который заменил ранее существовавшую рабочую группу по педиатрии (Paediatric Working Group, PWG). Основная задача PDCO заключается в определении исследований, которые фармацевтические компании обязаны проводить при разработке препаратов для детей в соответствии с планами педиатрических исследований (paediatric investigation plan, PIP).

В октябре 2017 г. Европейская комиссия опубликовала десятилетний отчет о выполнении постановлений № 1901/2006 и 1902/2006. В докладе показано увеличение количества лекарств для детей во многих терапевтических областях за последние десять лет, особенно в области ревматологии и инфекционных заболеваний. Однако отмечено, что прогресс в разработке препаратов для терапии именно детских заболеваний или патологий, для которых характерны биологические различия между взрослыми и детьми, особенно для редких заболеваний, является недостаточным¹⁴.

В настоящее время в ЕС и США действуют руководства, направленные на:

- поддержание и упрощение своевременной разработки педиатрических лекарственных препаратов;
- обеспечение проведения надлежащих исследований лекарственных препаратов и их разработки с соблюдением этических норм;
- обеспечение надлежащей регистрации лекарственных препаратов для использования в педиатрии;
- улучшение доступной информации об использовании лекарственных препаратов для лечения детей;
- уменьшение числа случаев использования препаратов вне утвержденных показаний согласно инструкции по медицинскому применению¹⁵.

⁸ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

⁹ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 21.12.2021 № 30 «О Руководстве по фармацевтической разработке лекарственных средств для применения в педиатрической практике».

¹⁰ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13.09.2021 № 23 «О Руководстве по определению возможности использования лекарственной формы лекарственного препарата в педиатрической практике или в отношении отдельной группы педиатрической популяции в целях указания соответствующих сведений в общей характеристике лекарственного препарата и инструкции по медицинскому применению».

¹¹ Regulation (EC) No 1901/2006 of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on medicinal products for paediatric use and amending regulation (EEC) No 1768/92, Directive 2001/20/EC, Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No. 726/2004.

¹² Regulation (EC) No 1902/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 amending Regulation 1901/2006 on medicinal products for paediatric use.

¹³ <https://www.ema.europa.eu/en/committees/paediatric-committee-pdco>

¹⁴ <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/paediatric-medicines/paediatric-regulation>

¹⁵ <https://toolbox.eupati.eu/resources/developing-medicines-for-children-overview/>

В марте 2020 г. было принято руководство ICH S11 по разработке и проведению доклинических исследований безопасности педиатрических лекарственных средств¹⁶. Документ утвержден Комитетом по лекарственным средствам для применения у человека (Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP) Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) и вступил в силу 26 сентября 2020 г. Целью данного руководства является разработка международных стандартов для гармонизации доклинических исследований безопасности при разработке лекарственных средств для применения в педиатрии. Это должно способствовать своевременному проведению клинических исследований в педиатрической популяции и сокращению использования животных в соответствии с принципами 3R. Рассматриваемые в руководстве ICH S11 лекарственные средства включают как продукты, которые ранее использовались у взрослых пациентов, так и препараты, которые предназначены исключительно для детей.

Основные принципы проведения доклинических исследований при разработке педиатрических препаратов

Согласно Руководству ЕАЭС по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов¹⁷ (разработано в соответствии с документом ICH M3(R2)¹⁸) для включения в клинические исследования детей требуется обоснование. Наиболее значимыми являются сведения о безопасности лекарственного препарата из ранее проведенных клинических исследований с участием взрослых пациентов. Эта информация должна быть получена до начала исследований в педиатрической популяции, хотя допускается ситуация, когда подобные сведения недоступны, поскольку препарат разрабатывается исключительно для терапии детских заболеваний. В руководстве особо отмечается, что решения о достаточности сведений по безопасности лекарственного препарата, полученных у взрослых пациентов, для начала клинических исследований у детей определяются в индивидуальном порядке. Таким образом, основное внимание должно уделяться клинической оценке пользы и риска. До начала

клинических исследований с участием детей должны быть доступны результаты следующих доклинических исследований на взрослых животных (табл. 1).

Доклинические исследования безопасности на животных служат прежде всего для получения информации о возможных токсических свойствах лекарственного препарата, которые недопустимо изучать при его клиническом применении [4]. В исследованиях репродуктивной токсичности лекарственных средств было показано, что организм является наиболее уязвимым в период органогенеза — процесса формирования и развития органов. В детском возрасте продолжается развитие центральной нервной, легочной и иммунной систем, почек, скелета, желудочно-кишечного тракта, репродуктивной системы, поэтому у детей возможны токсические реакции, которые не проявляются при исследованиях во взрослой популяции, когда данные органы и системы организма уже сформированы [5].

Одним из возможных способов минимизировать риск развития токсических реакций при применении лекарственного препарата у детей является проведение доклинических исследований безопасности на неполовозрелых животных. Для решения вопроса о необходимости данного вида исследований необходимо проанализировать результаты, полученные в экспериментах на половозрелых животных, имеющиеся клинические данные, класс-специфические эффекты препарата. Если будет признано, что имеющиеся сведения недостаточны для обоснования безопасности клинического исследования в педиатрической популяции, следует рассмотреть вопрос о необходимости проведения дополнительных доклинических исследований на неполовозрелых животных. Определяющим фактором для инициации таких исследований является возраст участников клинического исследования по отношению к продолжительности исследования. Если установлено возможное влияние препарата на рост и развитие растущего организма, а дети являются основной терапевтической популяцией, могут потребоваться длительные исследования на неполовозрелых животных.

Необходимо отметить, что, в отличие от токсикологических исследований на взрослых животных, которые являются достаточно

¹⁶ ICH S11 Nonclinical safety testing in support of development of paediatric pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/616110/2018.

¹⁷ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

¹⁸ ICH M3(R2) Nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. EMA/CPMP/ICH/286/1995.

Таблица 1. Виды доклинического изучения безопасности *in vivo* (на взрослых животных) и *in vitro*, результаты которых необходимы для начала педиатрических клинических исследований лекарственного препарата

Table 1. Types of non-clinical safety studies *in vivo* (in adult animals) and *in vitro* required for initiating paediatric clinical trials

Вид исследования <i>Study type</i>	Краткое описание <i>Short description</i>		
Токсичность при многократном введении <i>Repeated dose toxicity</i>	Максимальная длительность клинического исследования <i>Maximum duration of a clinical trial</i>	Рекомендуемая длительность введения препарата животным* <i>Recommended duration of medicinal product administration to animals*</i>	
		Грызуны <i>Rodents</i>	Негрызуны <i>Non-rodents</i>
	До 2 недель <i>Up to 2 weeks</i>	2 недели <i>2 weeks</i>	2 недели <i>2 weeks</i>
	Более 2 недель и до 6 месяцев <i>More than 2 weeks and up to 6 months</i>	Соответствует длительности клинического исследования <i>Corresponds to the duration of the clinical trial</i>	
	Более 6 месяцев <i>More than 6 months</i>	6 месяцев <i>6 months</i>	9 месяцев <i>9 months</i>
Фармакологическая безопасность <i>Safety pharmacology</i>	Основной набор (батарея) тестов: оценка воздействия на сердечно-сосудистую, центральную нервную и дыхательную системы <i>Core test suite (battery): assessment of effects on the cardiovascular, central nervous, and respiratory systems</i>		
Генотоксичность <i>Genotoxicity</i>	Стандартный набор исследований (вариант 1: генные мутации бактерий, <i>in vitro</i> цитогенетический тест хромосомных повреждений либо анализ генных мутаций в мышиной лимфоме, оценка генотоксичности <i>in vivo</i> ; вариант 2: генные мутации бактерий, оценка генотоксичности <i>in vivo</i> с использованием двух разных тканей**) <i>Standard set of studies (option 1: bacterial gene mutations, in vitro cytogenetic test for chromosomal damage or gene mutation analysis in mouse lymphoma, in vivo genotoxicity assessment; option 2: bacterial gene mutations, in vivo genotoxicity assessment in two different tissues**)</i>		
Репродуктивная токсичность <i>Reproductive toxicity</i>	Влияние препарата на фертильность, пре- и постнатальное развитие. Исследования эмбрионального и фетального развития не являются критичными для обоснования возможности проведения клинических исследований у пациентов мужского пола или препубертатных пациентов женского пола <i>Effects of the medicinal product on fertility, pre- and postnatal development. Embryonic and fetal development studies are not critical to justify clinical trials in male or prepubescent female patients</i>		
Канцерогенность <i>Carcinogenicity</i>	Определить необходимость изучения канцерогенности необходимо до начала длительных педиатрических исследований. Если отсутствуют существенные основания (положительные результаты при изучении генотоксичности, наличие проканцерогенного риска, обусловленного механизмом действия или эффектами, выявленными при изучении общетоксического действия), изучение канцерогенности для проведения клинических исследований у детей не требуется <i>The need for a carcinogenicity study should be determined prior to initiating long-term paediatric studies. If a carcinogenicity study is not sufficiently justified (by positive genotoxicity study results, pro-carcinogenic risks based on mechanistic considerations or findings from general toxicity studies), it is not required for initiating clinical trials in children.</i>		

* Более подробная информация указана в Руководстве¹⁹.

** Стандартные тесты указаны согласно ГОСТ Р 57130-2016²⁰.

* For additional information, see the EAEU Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals.¹⁹

** The standard studies are listed as per the Russian standard for genotoxicity testing of medicines (GOST R 57130-2016).²⁰

регламентированными, доклинические исследования на неполовозрелых (ювенильных) животных зачастую требуют индивидуального подхода. Формальное изучение общетоксического действия на неполовозрелых животных является неприемлемым. Разработчикам необходимо провести серьезную аналитическую работу для обоснования целесообразности

или нецелесообразности данного вида исследований. В случае выявления необходимости в их проведении требуется разработка плана и подробного протокола доклинического исследования на неполовозрелых животных с обозначением актуальных реперных точек безопасности конкретного лекарственного препарата.

¹⁹ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

²⁰ ГОСТ Р 57130-2016. Лекарственные средства для медицинского применения. Исследование генотоксичности и интерпретация полученных данных.

WoE-анализ и ключевые факторы риска при разработке педиатрических лекарственных препаратов

Weight of Evidence (WoE), «весомость доказательства» — аналитический подход, используемый в контексте оценки рисков (risk assessment). Однако широкое толкование понятия «весомости доказательств» и неопределенность трактовки могут привести к противоречивым оценкам риска одного и того же случая и обесценить применение самого подхода для оценки риска. Разнородность качественных и количественных характеристик факторов риска требует определенного консенсуса в отношении выделения среди них ограниченной группы ключевых факторов для успешного применения WoE-анализа [6]. В 2017 г. Европейское управление по безопасности пищевых продуктов (European Food Safety Authority, EFSA) опубликовало руководящий документ по использованию подхода WoE [7] во всех областях, входящих в компетенцию данной организации. Оценка весомости доказательств определяется в настоящем руководстве как процесс, в ходе которого доказательства объединяются для определения относительной поддержки возможных ответов на вопрос. В данном документе достоверность (надежность), актуальность и согласованность указаны в качестве трех основных критериев для оценки весомости доказательств с точки зрения их значимости:

- надежность — это степень, в которой информация, содержащая часть или ряд доказательств, является правильной;
- актуальность — это вклад, который отдельные доказательства или цепочки доказательств внесли бы в ответ на определенный вопрос, если бы информация, содержащая линию доказательств, была полностью надежной;
- согласованность — это степень, в которой вклад различных частей или линий доказательств в ответ на указанный вопрос является совместимым.

Необходимо отметить, что в настоящее время специальные руководства по применению WoE-анализа при разработке лекарственных, в том числе педиатрических, препаратов отсутствуют. При отсутствии руководящих документов значимость ключевых факторов можно рассматривать как «вопрос суждения: достаточно ли собрано свидетельств, чтобы исключить альтернативные объяснения» [8].

Согласно руководству ICH S11 рекомендовано использовать WoE-подход при разработке общего плана доклинических исследований для определения оправданности проведения дополнительных доклинических исследований педиатрического препарата. Особо подчеркивается, что по мере развития клинической разработки могут быть внесены коррективы в оценку WoE на основе совокупности доступных данных. Результаты WoE могут отличаться для одного и того же лекарственного средства в зависимости от изменения возраста детей, показаний и продолжительности терапии. Программа доклинических исследований педиатрического лекарственного препарата зависит от комплексной оценки, основанной на совокупности доказательств, включая клинический контекст вместе с данными фармакодинамики, фармакокинетики (absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME) и доклинических исследований *in vitro* и *in vivo*, а также от имеющихся клинических данных о безопасности препарата для взрослых и (или) детей, т.е. при разработке программы необходимо использовать подход WoE. Этот подход предполагает оценку влияния совместно нескольких факторов, ни один фактор не следует рассматривать изолированно. Важность каждого фактора следует оценивать таким образом, чтобы в окончательном решении был сделан вывод о том, в полной ли мере имеющиеся данные учитывают проблемы безопасности в предлагаемой педиатрической популяции, или же необходимы дополнительные доклинические исследования. Кроме того, следует учитывать возможность экстраполяции данных, полученных в исследованиях на неполовозрелых животных, на человека (ребенка) и биологическую значимость этих данных. Оценка WoE должна проводиться с самого начала разработки педиатрического препарата и пересматриваться при появлении новых сигналов, связанных с безопасностью, полученных в доклинических или клинических исследованиях, при изменении возрастных диапазонов целевой популяции, пути введения препарата, продолжительности лечения, лекарственной формы и (или) показаний к применению. Исход WoE может быть разным для каждого клинического исследования в зависимости от конкретной педиатрической популяции и заболевания, для терапии которого создается препарат. На рисунке 1 показаны ключевые факторы, которые следует учитывать при оценке WoE²¹. Наиболее важными факторами, которые должны быть

²¹ ICH S11 Nonclinical safety testing in support of development of paediatric pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/616110/2018.

тщательно взвешены, являются минимальный возраст пациента и наличие предполагаемого неблагоприятного воздействия препарата на развивающиеся органы и системы организма. Необходимо отметить, что прочие факторы приведены без учета порядка их значимости (рис. 1). Список ключевых факторов не является исчерпывающим, для каждой конкретной ситуации возможно появление дополнительных критериев, которые следует учитывать (например, снижение риска).

Виды экспериментальных животных

В странах ЕАЭС для проведения исследований на неполовозрелых животных, как правило, достаточно использовать один вид животных²². Согласно руководству ICH S11²³ при выборе релевантного вида животных следует учитывать следующие факторы.

1. Онтогенез фармакологической или токсикологической мишени (например, рецептора) у животных по сравнению с предполагаемой детской популяцией.

2. Вид и сток, для которого имеются данные, полученные при изучении токсичности при повторном введении на взрослых особях, является предпочтительным, поскольку это позволяет сравнивать профили токсичности и системного воздействия препарата у ювенильных и взрослых животных.

3. Токсикологические органы-мишени:

- относительная стадия развития органов/систем у молодых животных по сравнению с предполагаемой детской популяцией,
- способность тест-системы (экспериментальных животных) выявлять конечные точки токсичности, вызывающие озабоченность.

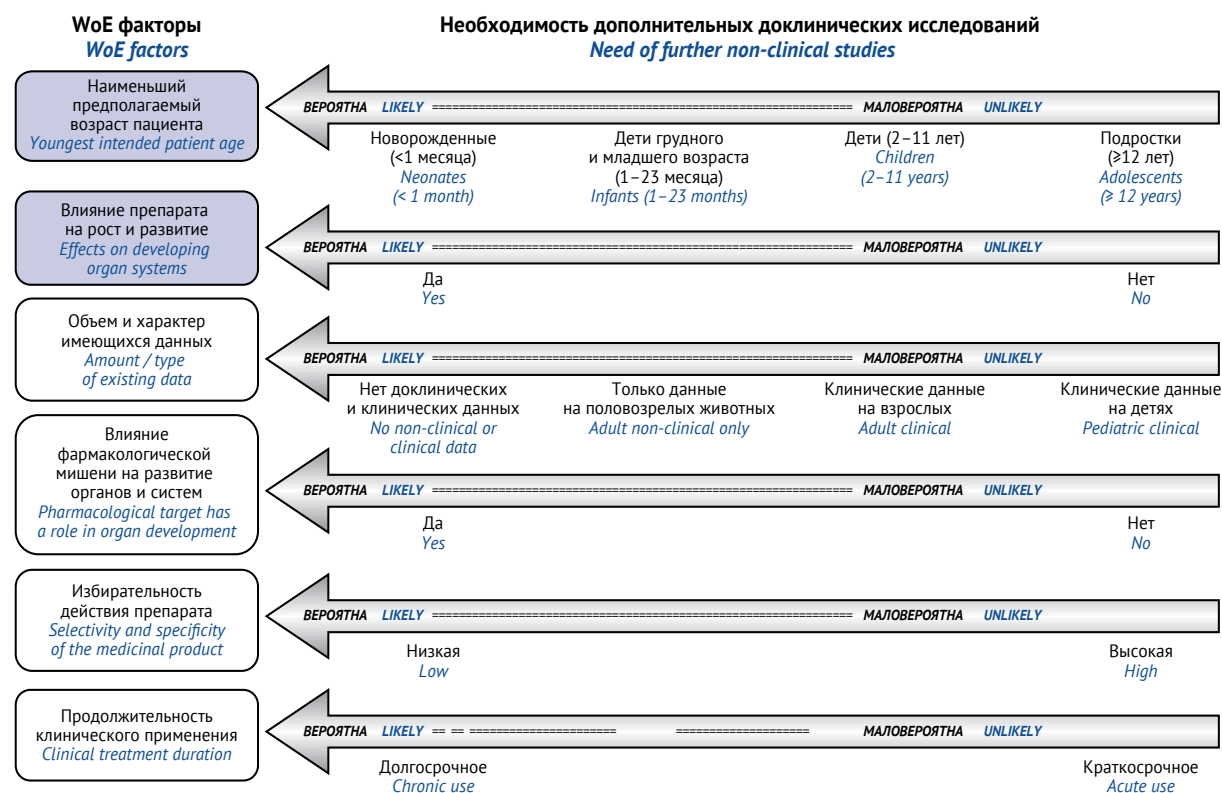


Рис. 1. Ключевые факторы WoE, которые следует учитывать при оценке необходимости проведения доклинических исследований. Наиболее важные факторы выделены заливкой голубого цвета, остальные факторы перечислены без учета порядка их значимости (цитируется по источнику ICH S11²⁴, с изменениями).

Fig. 1. Key WoE factors to be considered when determining if non-clinical studies are warranted. The most important factors are filled with blue; the other factors are listed without regard to their importance (adapted from ICH S11²⁴).

²² Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

²³ ICH S11 Nonclinical safety testing in support of development of paediatric pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/616110/2018.

²⁴ Там же.

4. Сходство фармакокинетических параметров (ADME) животных и человека.

5. Техническая/практическая возможность проведения исследования на выбранных видах животных.

Важным фактором, который необходимо учитывать при разработке программы исследований на неполовозрелых животных, является возраст детей, участвующих в клиническом исследовании. Одним из основных критериев выбора подходящего вида и возраста животных является сопоставимость постнатального развития органов и систем у животных и целевой педиатрической популяции [9, 10]. Справочная информация о сравнительном онтогенетическом развитии органов и систем животных и человека приведена в приложении к руководству ICH S11.

Также необходимо учитывать результаты, полученные в экспериментах на взрослых (половозрелых) животных, а именно:

- фармакодинамические и фармакокинетические свойства препарата,
- вид животных, который был использован при изучении токсичности при повторном введении,
- установленные органы-мишени, токсические эффекты, токсические и нетоксические дозы препарата.

Рисунок 2 иллюстрирует, какие виды неполовозрелых животных наиболее часто используют в доклинических исследованиях безопасности. Были проанализированы 164 PIP за период с 2007 до 2013 г. [10]. Наиболее распространенным видом животных были крысы (67%), собак использовали 9% разработчиков, мышей — 5%, обезьян — 4%, карликовых свиней — 2%. В 20 PIP вид животных не был указан (что составило 11%) [10].

При подготовке документов для получения разрешения на проведение педиатрического клинического исследования, а затем и модулей регистрационного досье на лекарственный препарат разработчику необходимо представить обоснование релевантности экспериментальных животных, которые были использованы в доклинических исследованиях безопасности. Необходимо учитывать прежде всего следующее:

- возраст педиатрических пациентов и возможность изучить на животных влияние препарата на развивающиеся органы и системы (сравнительное развитие постнатальных органов в детской популяции и животных),
- фармакодинамические (первичная и вторичная фармакодинамика) и фармакокинетические (ADME, образование активных метаболитов) характеристики препарата,
- вид взрослых животных, который был использован при проведении доклинических исследований безопасности лекарственного средства.

Наиболее часто при проведении доклинических исследований безопасности на неполовозрелых животных используют грызунов, чаще всего крыс. Это связано с наличием обширного опыта работы с этим видом животных, исторических данных экспериментальных лабораторий, возможности обеспечить достаточное количество особей для получения статистически достоверных результатов (в том числе для самого раннего возраста). Для крыс разработан широкий спектр нейроповеденческих тестов, использование этого вида животных позволяет оценить влияние препарата на полный период постнатального развития. Однако существуют и ограничения, которые затрудняют разработку препарата и проведение успешных исследований.



Рис. 2. Виды, наиболее часто используемые при проведении исследований на неполовозрелых животных (по N.N. Kim и соавт. [10], с изменениями).

Fig. 2. Species most commonly used in juvenile toxicology studies (adapted from N.N. Kim et al. [10]).

Например, грызуны могут быть фармакологически нерелевантным видом, небольшой размер животного ограничивает количество путей введения препарата и лимитирует объем и количество проб при отборе биологических образцов.

Процесс введения препарата животному является достаточно ответственной процедурой, особенно если в эксперименте необходимо задействовать новорожденных особей. Таблица 2 иллюстрирует доступные пути введения в зависимости от времени после рождения для разных видов лабораторных животных.

Данная таблица иллюстрирует прежде всего техническую возможность выполнения манипуляции с новорожденными особями. Решение о сроках начала эксперимента принимается на основании сравнительного онтогенеза животных и детей, для которых разрабатывается препарат. Так, согласно [11] самый младший возраст для начала введения препарата при проведении исследований на ювенильных животных находится между 7 сут после рождения (для печени, иммунной системы, костей, легких,

репродуктивных органов, кожи, почек у мышей) и 14 сут после рождения (для глаз, почек у крыс). При этом авторы приводят данные, которые ставят под сомнение целесообразность использования крысят раньше чем на 10 сут после рождения в связи с несоответствием их онтогенеза доношенному ребенку.

При проведении исследований на неполовозрелых животных важным является выбор объемов для соответствующего пути введения изучаемого препарата с учетом решения экспериментальной задачи и обеспечения благополучия животных. Необходимо отметить, что вопрос о рекомендуемых объемах введения препаратов различным видам экспериментальных животных от рождения до достижения половой зрелости еще не получил должного освещения в рекомендациях по проведению доклинических исследований. При отсутствии обоснованных рекомендаций следует ориентироваться на установленные объемы введения для соответствующих видов половозрелых животных с поправкой на анатомо-физиологические

Таблица 2. Возраст животного при первом возможном введении препарата (цитируется по N.N. Kim и соавт. [10])

Table 2. Minimum age of animals for dosing initiation (from N.N. Kim et al. [10])

Путь введения <i>Route of administration</i>	Возраст животного, сут <i>Animal age, days</i>				
	Мыши <i>Mice</i>	Крысы <i>Rats</i>	Кролики <i>Rabbits</i>	Собаки <i>Dogs</i>	Карликовые свиньи <i>Mini pigs</i>
Перорально <i>Oral gavage</i>	4	1	14	1	1
Подкожно <i>Subcutaneous</i>	1	1	6	1	1
Внутримышечно <i>Intramuscular</i>	1	1	6	1	1
Внутривенно болюсно (повторно) <i>Intravenous bolus (repeated)</i>	7	4	6	1	7*
Внутривенно инфузионно <i>Intravenous infusion</i>	21	21	28	56	7*
Ингаляционно (все тело) <i>Inhalation (whole body)</i>	4	4	6	10	2–7
Ингаляционно (в носовую полость) <i>Inhalation (nose only)</i>	21	21	28	4**	4**
Накожно*** <i>Dermal ***</i>	21	21	28	42	28

* Трудновыполнимо, так как нет легкодоступных вен (катетер возможно установить на 7 сут после рождения).

** Применение ингаляционных масок возможно для животных в возрасте 4 сут после рождения, однако могут возникнуть проблемы с фиксацией животных.

*** Не рекомендуется для животных, находящихся на грудном вскармливании.

* Administration via this route is difficult, as there are no easily accessible veins (a vascular implant port can be installed after postnatal day 7).

** Masks can be fitted to animals as young as postnatal day 4, but restraint issues may arise.

*** Not recommended in pre-weaning animals.

характеристики неполовозрелых особей (например: масса тела, объем циркулирующей крови, объем желудка и др.).

Крыса от первых суток и примерно до 14 сут после рождения является единственной моделью, позволяющей оценить безопасность применения препарата для организма в фазах развития от недоношенного до новорожденного ребенка [5]. Авторы отмечают, что для детей такого возраста наиболее часто используют внутривенный путь введения. Однако поскольку масса тела крысят при рождении составляет всего 6–7 г, возникают существенные и зачастую непреодолимые технические проблемы при внутривенном введении исследуемого препарата [5].

Если в экспериментах на ювенильных животных не может быть достигнута системная экспозиция, соответствующая ожидаемой у пациентов детского возраста, то даже при использовании альтернативного пути введения или увеличенной частоте введения препарата исследования не являются информативными и оправданными.

Еще одной серьезной проблемой при проведении исследований на неполовозрелых животных является интерпретация результатов гистопатологических исследований [10]. Это связано с тем, что существует определенный дефицит знаний о норме и патологии при развитии тканей ювенильных животных, так как большая часть гистопатологических данных относится к описанию тканей взрослых животных. Одним из решений данной проблемы является создание в экспериментальных лабораториях, проводящих патогистологические исследования, справочных и графических гистопатологических библиотек.

В целом следует заключить, что получить ценную информацию для идентификации и характеристики риска применения препарата у детей из доклинических исследований безопасности на неполовозрелых животных можно только в том случае, если они тщательно спланированы и научно обоснованы для решения конкретных проблем, связанных с введением препарата в течение соответствующего периода онтогенетического развития.

Заключение

Расширение номенклатуры лекарственных средств, предназначенных для применения в педиатрии (имеющих соответствующие лекарственные формы, дозировки, утвержденные показания к применению и режим дозирования), необходимо как в России, так и за рубежом.

Доклинические и клинические исследования лекарственных препаратов для педиатрии имеют ряд особенностей, обусловленных специфическим риском токсического действия на рост и развитие детей, возрастными различиями физиологии организма детей и взрослых и необходимостью научного обоснования переноса клинических и доклинических данных о безопасности препарата, применяемого у взрослых, на его применение в педиатрии.

Особенностью программы доклинических исследований препаратов для педиатрии является возможное включение исследований на ювенильных (неполовозрелых) животных. Такие исследования проводятся только при недостаточности клинических и доклинических данных для оценки безопасности применения препарата у детей и, как правило, нуждаются в научном обосновании целесообразности с точки зрения информативной ценности и соблюдения этических принципов при работе с лабораторными животными.

Поскольку дети являются пациентами, входящими в группы повышенного риска, при разработке лекарственных препаратов для педиатрии необходимо минимизировать неоправданные риски. Доклинические исследования безопасности лекарственных средств для педиатрии должны проводиться с использованием современных научно-методических подходов на основе релевантной оценки и экстраполяции результатов исследований и ключевых факторов риска для конкретной возрастной популяции педиатрических пациентов.

В случае выявления недостаточности имеющихся данных по безопасности и при обосновании целесообразности исследований на неполовозрелых животных требуется разработка подробного протокола исследования на релевантных животных, которые должны соответствовать по возрасту и стадии развития критических органов и систем возрастной группе педиатрических пациентов с обозначением актуальных реперных точек безопасности для конкретного лекарственного препарата.

Дизайн исследования должен обеспечить максимальный охват фаз роста и развития органов и систем, подверженных риску в педиатрической популяции. Необходимо учитывать техническую осуществимость исследования и достижения конечных точек. Если в экспериментах на ювенильных животных не может быть достигнута системная экспозиция, соответствующая

ожидаемой у пациентов детского возраста, исследования не являются информативными и оправданными.

Кроме того, следует также иметь в виду, что разработка программы исследования потребует участия квалифицированных специалистов в обработке и анализе большого объема научных данных. Исследователи, в том числе патоморфологи и гистологи, должны обладать специальными знаниями о нормальном развитии органов и тканей экспериментальных

животных на протяжении постнатального периода.

Программа доклинических исследований педиатрических препаратов должна соответствовать комплексной оценке значимости ключевых факторов риска в каждом конкретном случае на основе анализа весомости доказательств (WoE). Вывод о безопасности применения лекарственного препарата у детей должен базироваться на оценке риска в релевантных клинических и доклинических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Вольская ЕА. Пять лет спустя: регулирование педиатрических клинических исследований в действии. *Ремедиум*. 2013;(3):8–17.
Volskaya EA. Five years later: regulation of pediatric clinical trials in action. *Remedium*. 2013;(3):8–17 (In Russ.).
2. Смоленов ИВ. Педиатрические клинические исследования: от поощрений — к регуляторным требованиям. *Педиатрическая фармакология*. 2010;7(4):7–11.
Smolenov IV. Pediatric clinical trials: from encouragement to regulatory requirements. *Pediatric Pharmacology*. 2010;7(4):7–11 (In Russ.).
3. Романов БК, Зырянов СК. Фармакология особых популяций: крайний возраст. *Качественная клиническая практика*. 2019;(2):70–4.
Romanov BK, Zyryanov SK. Pharmacology in special populations: extreme age. *Good Clinical Practice*. 2019;(2):70–4 (In Russ.).
<https://doi.org/10.24411/2588-0519-2019-10074>
4. Таубэ АА. Регуляторные аспекты доклинических и клинических исследований лекарственных препаратов. *Фармация*. 2020;69(6):38–45.
Taube AA. Regulatory aspects of preclinical and clinical trials of drugs. *Pharmacy*. 2020;69(6):38–45 (In Russ.).
<https://doi.org/10.29296/25419218-2020-06-07>
5. Downes N. Juvenile toxicity: are we asking the right questions? *Toxicol Pathol*. 2012;40(5):830–7.
<https://doi.org/10.1177/0192623312439124>
6. Weed DL. Weight of evidence: a review of concept and methods. *Risk Anal*. 2005;25(6):1545–57.
<https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2005.00699.x>
7. EFSA Scientific Committee, Hardy A, Benford D, Hall-dorsson T, Jeger MJ, Knutsen HK. Guidance on the use of the weight of evidence approach in scientific assessments. *EFSA J*. 2017;15(8):e04971.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4971>
8. Котеров АН, Ушенкова ЛН, Бирюков АП. Критерий Хилла «биологическое правдоподобие». Интеграция данных из различных дисциплин в эпидемиологии и радиационной эпидемиологии. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2020;60(5):453–80.
Koterov AN, Ushenkova LN, Biryukov AP. Hill's "biological plausibility" criterion. Integration of data from various disciplines in epidemiology and radiation epidemiology. *Radiation Biology. Radioecology*. 2020;60(5):453–80 (In Russ.).
<https://doi.org/10.31857/S0869803120050069>
9. Cappon GD, Bailey GP, Buschmann J, Feuston MH, Fisher JE, Kok Wah Hew, et al. Juvenile animal toxicity study designs to support pediatric drug development. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2009;86(6):463–9.
<https://doi.org/10.1002/bdrb.20220>
10. Kim NN, Parker RM, Weinbauer GF, Remick AK, Steinbach T. Points to consider in designing and conducting juvenile toxicology studies. *Int J Toxicol*. 2017;36(4):325–39.
<https://doi.org/10.1177/1091581817699975>
11. Schmitt G, Barrow P. Considerations for and against dosing rodent pups before 7 days of age in juvenile toxicology studies. *Reprod Toxicol*. 2022;112:77–87.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.06.010>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Г.Н. Енгальцева — написание текста рукописи, ответственность за целостность всех частей статьи; Р.Д. Сюбаев — редактирование текста рукописи, утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Galina N. Engalycheva drafted the manuscript and agreed to be accountable for the integrity of all parts of the work. Rashid D. Syubaev edited the manuscript and approved the final version for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Конфликт интересов. Р.Д. Сюбаев является членом редколлегии журнала «Ведомости НЦЭСМП. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств»; Г.Н. Енгальчева заявила об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project № 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Conflict of interest. Rashid D. Syubaev is a member of the Editorial Board of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*; Galina N. Engalycheva declares no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Енгальчева Галина Нинелевна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5121-0858>

Engalycheva@expmed.ru

Сюбаев Рашид Даутович, д-р мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6729-2349>

Subaev@expmed.ru

Galina N. Engalycheva, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5121-0858>

Engalycheva@expmed.ru

Rashid D. Syubaev, Dr. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6729-2349>

Subaev@expmed.ru

Поступила 30.09.2022

После доработки 20.10.2022

Принята к публикации 21.11.2022

Online first 17.02.2023

Received 30 September 2022

Revised 20 October 2022

Accepted 21 November 2022

Online first 17 February 2023



К.Л. Крышень 
Н.М. Фаустова 
М.Н. Макарова 
В.Г. Макаров 

Эндокринные нарушения при применении лекарственных средств: подходы к доклинической оценке безопасности

Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ»,
Заводская ул., д. 3, к. 245, г.п. Кузьмоловский, Всеволожский р-н,
Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

✉ Крышень Кирилл Леонидович; kryshen.kl@doclinika.ru

РЕЗЮМЕ

Эндокринная система координирует работу практически всех органов и систем организма позвоночных, в том числе такие важные биологические функции, как метаболизм, развитие, размножение и поведение. На сегодняшний день накоплено значительное количество информации об эндокринных нарушениях при использовании химических соединений (эндокринных дизрапторов) в различных отраслях деятельности человека. **Цель работы** — оценка возможности проведения на стадии доклинических исследований анализа рисков функционального нарушения эндокринной системы при применении новых лекарственных средств. С эндокринными дизрапторами связан широкий спектр нежелательных явлений, включая проблемы развития, возникающие из-за нарушения функционирования эндокринной системы. Особенности эндокринных нарушений, вызванных дизрапторами, являются длительным латентный период между воздействием и проявлением дисфункции, отсутствие линейной зависимости «доза–эффект», зависимость степени нарушений от момента начала и длительности воздействия. К основным механизмам влияния химических веществ на эндокринную систему относят их взаимодействие с рецепторами клеток, чувствительных к влиянию определенных гормонов, влияние на экспрессию генов и внутриклеточную передачу сигналов, транспорт гормонов и др. В обзоре обсуждена возможность использования показателей уровней гормонов как индикаторов эндокринной токсичности и приведены литературные и собственные данные о нормах содержания основных гормонов в крови животных. Включение анализа уровней основных гормонов крови животных в программу регистрационных доклинических исследований позволит оценить риски потенциальных угроз ятрогенного происхождения.

Ключевые слова: эндокринная система; нарушения; эндокринные дизрапторы; доклинические исследования; лекарственные средства

Для цитирования: Крышень К.Л., Фаустова Н.М., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Эндокринные нарушения при применении лекарственных средств: подходы к доклинической оценке безопасности. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(1):27–41. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-401>

K.L. Kryshen 
N.M. Faustova 
M.N. Makarova 
V.G. Makarov 

Endocrine Disorders Associated with Medicinal Products: Approaches to Preclinical Safety Assessment

Joint Stock Company "Scientific and Production Association HOME OF PHARMACY",
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement,
Vsevolzhsky district, Leningrad region 188663, Russian Federation

✉ Kirill L. Kryshen; kryshen.kl@doclinika.ru

ABSTRACT

The endocrine system coordinates almost all organs and other systems in vertebrates. In particular, it regulates such important biological functions as metabolism, development, reproduction, and behaviour. To date, a significant amount of information has accumulated on endocrine disorders associated with chemical compounds (endocrine disruptors) used in various fields of human activity. **The aim of this study** was to evaluate the possibility of preclinical risk assessment for the endocrine function disorders attributable to new medicinal products. Endocrine disruptors are associated with a wide range of adverse events, including developmental problems arising from functional abnormalities of the endocrine system. Endocrine disorders caused by endocrine-disrupting chemicals are characterised by a long latency period between exposure and manifestation of a dysfunction; a nonlinear dose–response relationship; and a linear correlation of damage severity to exposure timing and duration. The chemicals influence the endocrine system through multiple mechanisms, the main of which being the interaction with cellular receptors sensitive to certain hormones and the influence on gene expression, intracellular signalling, and hormone transport, etc. This paper discusses the possibility of using hormone levels as indicators of endocrine disruption and presents the literature and authors' own data on normal levels of relevant hormones in the blood of animals. An analysis of animal blood hormone levels in preclinical programmes will provide an opportunity to evaluate potential iatrogenic risks.

Key words: endocrine system; disorders; endocrine disruptors; preclinical studies; pharmaceuticals

For citation: Kryshen K.L., Faustova N.M., Makarova M.N., Makarov V.G. Endocrine disorders associated with medicinal products: approaches to preclinical safety assessment. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):27–41. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-401>

Введение

Эндокринная система управляет физиологическими функциями организма с момента зачатия. Гормональный баланс может быть нарушен воздействием различных химических веществ, в том числе лекарственных средств, что подтверждено многочисленными примерами [1–8].

В 1962 г. Р. Карсон одной из первых привлекла внимание мировой общественности к проблеме чрезмерного антропогенного загрязнения дикой природы химическими веществами, опубликовав монографию «Безмолвная весна» [3]. Заглавие книги отражает наблюдавшуюся в США, Южной Европе, Азии и Африке массовую гибель насекомых и хищных птиц после начала широкого применения в сельском хозяйстве

пестицида дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ). Установлено, что ДДТ, накапливаясь в организме птиц, оказывает негативное влияние на их репродуктивную способность и минерализацию скорлупы яиц путем снижения уровня циркулирующего полового гормона эстрадиола и прогестерона [3, 4]. В организм человека ДДТ может поступать с продуктами питания и водой. Было обнаружено, что девочки, подвергавшиеся воздействию ДДТ в высоких концентрациях внутриутробно в 1960-х годах, имели повышенный риск развития рака груди в последующие 50 лет [5].

В качестве другого примера можно привести диэтилstilбэстрол (ДЭС) — синтетический аналог эстрогенов, превосходящий эстрадиол

по биологической активности в несколько раз, применявшийся в рамках гормональной терапии во время беременности для предотвращения выкидышей, а также при недостаточности гормональной функции яичников и для лечения рака молочной железы. В 1971 г. Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) было запрещено его использование из-за подтвержденных случаев возникновения рака влагалища у девочек, рожденных от матерей, принимавших ДЭС. Позже было показано, что внутриутробное воздействие ДЭС связано также и с другими расстройствами репродуктивной системы, бесплодием, высокими показателями самопроизвольных аборт. У мальчиков наблюдался повышенный риск развития генитальных аномалий, рака простаты и яичек [6]. Большинство побочных эффектов ДЭС вскоре были продемонстрированы на моделях с использованием животных [6–8], что прямо подтверждает необходимость проведения детальных доклинических исследований безопасности лекарственных средств.

На международной конференции в 1991 г. (Wingspread conference) было признано существование глобальной проблемы эндокринных нарушений, вызванных антропогенными химическими соединениями как у диких животных, так и у человека¹. В связи с очевидными фактами развития эндокринных нарушений, ассоциированных с применением химических веществ различных классов, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определила данное направление в числе приоритетных областей исследований².

Нарушение функций эндокринной системы беспозвоночных, рыб, теплокровных животных, а также человека может быть вызвано разнообразными химическими веществами, включая синтетические химические вещества (например, полихлорированные и полибромированные бифенилы, диоксины), пластификаторы (например, фталаты, бисфенол А), пестициды (например, атразин, хлорпирифос, ДДТ и др.), фунгициды (например, винклозолин, оловоорганические соединения) и фармацевтические субстанции [9]. Для химических веществ, оказывающих негативное воздействие на эндокринную систему, в зарубежной англоязычной литературе

используется термин «endocrine disruptor», что дословно переводится как «эндокринный разрушитель». ВОЗ и Международной программой по химической безопасности (International Programme on Chemical Safety, IPCS) в 2002 г. предложено следующее определение эндокринных дизрапторов: «эндокринный дизраптор — это экзогенное вещество или смесь веществ, которые изменяют функцию эндокринной системы и применение которых имеет неблагоприятные последствия для здоровья организма, его потомков или (суб)популяции»³.

В отечественной литературе данную проблему одними из первых осветили Н.В. Яглова и В.В. Яглов в работе [10], где было предложено следующее определение: «Эндокринные дизрапторы — экзогенные вещества; содержатся в почве, воде, воздухе, пищевых продуктах и некоторых промышленных изделиях, которые, поступая в организм, оказывают гормоноподобные эффекты: нарушают гомеостатические механизмы регуляции эндогенными гормонами процессов жизнедеятельности живых организмов».

В национальном регуляторном поле к настоящему моменту нет описания и не разработана терминология химических веществ, негативно влияющих на эндокринную систему, отсутствуют система и подходы к тестированию химических соединений и лекарственных средств, потенциально способных вызвать эндокринные нарушения.

Цель работы — оценка возможности проведения на стадии доклинических исследований анализа рисков функционального нарушения эндокринной системы при применении новых лекарственных средств.

Концепции эндокринных нарушений: время, доза и нелинейные эффекты

Развитие нового направления в токсикологии сопровождалось выделением трех ключевых принципов (концепций) эндокринных нарушений [11]. Первая концепция, получившая название «эмбриональная основа болезней взрослого», основана на следующем наблюдении: латентный период между воздействием на плод и проявлениями физической или поведенческой дисфункции может быть очень долгим, вплоть до десятилетий. Воздействие факторов окружающей среды, в том числе токсичных веществ,

¹ Commission Regulation (EU) 2018/605 of 19 April 2018 amending Annex II to Regulation (EC) No 1107/2009 by setting out scientific criteria for the determination of endocrine disrupting properties. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2018/605/oj>

² World Health Organisation. Parma declaration on environment and health. Fifth Ministerial Conference on Environment and Health. Protecting children's health in a changing environment. Parma; 2010.

³ The World Health Report: 2002. Reducing risks, promoting healthy life. WHO; 2002.

на этапе внутриутробного развития может вызывать заболевания, которые появляются спустя годы, например онкологические заболевания, бесплодие, преждевременное половое созревание, сахарный диабет и ожирение [11–13].

Вторая концепция заключается в отсутствии линейной зависимости между дозой ЭД, попавших в организм, и реакцией организма. Эта концепция противоположна фундаментальному токсикологическому принципу *sola dosis facit venenum* («доза создает яд»). Стандартный подход в токсикологии заключается в том, что неблагоприятные эффекты возрастают пропорционально уровню воздействия, и существует некий порог, ниже которого не наблюдается никакого эффекта (уровень отсутствия наблюдаемого неблагоприятного эффекта, No Observed Adverse Effect Level, NOAEL). Однако появляется все больше свидетельств того, что эффекты, вызываемые ЭД, не могут быть адекватно спрогнозированы с помощью классической модели, поскольку зависимость «доза–эффект» имеет не линейную форму, а приближается к U-образной или перевернутой U-образной кривой [11, 14–16]. Вероятно, такая зависимость объясняется тем, что возможна интеграция двух различных механизмов действия, каждый из которых реализуется в различном диапазоне доз. Так, например, ДДТ и подобные ему соединения в низких дозах потенциально могут влиять на секрецию эстрогена (или андрогена), а при воздействии доз, близких к полулетальной (LD50), могут действовать как мощный нейротоксин [17].

Третья концепция нарушения эндокринной системы заключается в том, что решающее значение имеют продолжительность и момент воздействия токсиканта, поскольку существуют критические периоды развития организма (например, органогенеза, полового созревания и др.), когда повышается чувствительность к гормонам и, соответственно, к ЭД. Так, например, наличие и степень нарушений при применении ДЭС существенно различались в зависимости от момента его первого применения матерью, полученной дозы и продолжительности лечения [11, 18].

Основные механизмы действия эндокринных дизрапторов

На стадии разработки и доклинических исследований новых лекарственных средств необходимо понимание механизмов эндокринных нарушений, связанных с воздействием химических соединений на организм. В работе [1]

описаны основные механизмы нарушения эндокринной системы при воздействии химических соединений (табл. 1).

Большинство публикаций на тему ЭД касаются веществ, используемых в химической промышленности, пестицидов и фармацевтических субстанций гормоноподобной структуры. В меньшей степени в литературе освещены проблемы нарушений регуляции эндокринной системы, связанные с применением лекарственных препаратов негормональной природы. S. Sabir и соавт. в 2018 г. представили читателям сводный материал по негормональным лекарственным препаратам, влияющим на эндокринную систему (табл. 2) [19]. К числу основных негормональных ЭД относят антипсихотические, противозепептические, гипотензивные, противовирусные, противодиабетические и противоопухолевые препараты, которые могут влиять на продукцию гормонов, способствовать повышению риска развития сахарного диабета, вызывать изменение функционирования репродуктивной системы.

Регуляторные аспекты оценки безопасности эндокринных дизрапторов

В Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) в 1996 г. была создана консультативная группа по разработке руководства тестирования и оценки ЭД. Первым документом, регламентирующим выявление химических веществ, влияющих на эндокринную систему, стало Руководство по оценке химических реагентов по воздействию на эндокринную систему (2012 г.), которое предназначалось для интерпретации результатов отдельных тестов и сбора доказательств того, может ли вещество быть ЭД⁴. В 2018 г. ОЭСР опубликовало обновленное руководство по оценке эндокринной токсичности, в котором подробно представлена концепция и программа тестирования, а также подходы к анализу данных⁵.

В руководстве ОЭСР предложена поэтапная система оценки ЭД.

Этап 1. Анализ информации о веществе (физико-химические свойства, молекулярная масса, летучесть и др., токсикологические данные, прогнозы *in silico*, данные метаболизма).

Этап 2. *In vitro* исследование механизмов эндокринных нарушений под действием химического вещества (взаимодействие с рецепторами стероидных гормонов, влияние на ароматазу, ингибирование тиреопероксидазы и др.,

⁴ Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption. Paris: OECD; 2012.

⁵ Revised guidance document 150 on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption. Paris: OECD; 2018.

Таблица 1. Механизмы действия эндокринных дизрапторов (по М.А. La Merrill и соавт. [1], с изменениями)**Table 1.** Mechanisms of action of endocrine disruptors (adapted from M.A. La Merrill et al. [1])

Механизм действия <i>Mechanism of action</i>	Пример <i>Example</i>
Взаимодействие с гормональным рецептором по принципу лиганда или агониста <i>Interaction with hormone receptors (binding or agonism)</i>	Дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) связывается с эстрогеновыми рецепторами (ER) типов α и β и стимулирует ER-зависимую активацию транскрипции и пролиферацию <i>Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) binds to oestrogen receptors alpha (ERα) and beta (ERβ) and stimulates ER-dependent transcriptional activation and proliferation</i>
Антагонизм к гормональному рецептору <i>Antagonism of hormone receptors</i>	Дихлордифенилдихлорэтилен (ДДЭ) ингибирует связывание андрогенов с рецептором в клетках предстательной железы <i>Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) inhibits androgens binding to the androgen receptor in prostate cells</i>
Влияние на экспрессию гормонального рецептора (в том числе распределение в тканях) <i>Influence on hormone receptor expression (and tissue distribution)</i>	Бисфенол А изменяет экспрессию рецепторов эстрогена, окситоцина и вазопрессина и уменьшает опосредованную протеасомой деградацию рецептора ER β <i>Bisphenol A alters the expression of oestrogen, oxytocin and vasopressin receptors and reduces proteasome-mediated degradation of ERβ</i>
Влияние на внутриклеточный сигналинг <i>Alteration of intracellular signalling</i>	Бисфенол А индуцирует пролиферацию клеток Сертоли посредством фосфорилирования митоген-активируемой протеинкиназы, регулируемой внеклеточным сигналом (МАР-киназы ERK) <i>Bisphenol A induces Sertoli cell proliferation through phosphorylation of extracellular signal-regulated mitogen-activated kinase (ERK/MAPK)</i>
Эпигенетические механизмы в гормон-продуцирующих клетках или клетках-мишенях (например, модификация хроматина, метилирование ДНК или экспрессия некодирующей РНК) <i>Epigenetic mechanisms in hormone-producing or target cells (for example, chromatin modification, DNA methylation or non-coding RNA expression)</i>	Метоксихлор увеличивает экспрессию ДНК-метилтрансферазы DNMT3B, что приводит к гиперметилированию ДНК, в том числе генов эстрогеновых рецепторов <i>Methoxychlor increases the expression of DNA methyltransferase 3β (DNMT3β), which leads to hypermethylation of DNA, including oestrogen receptor genes</i>
Влияние на синтез гормонов (например, изменение экспрессии или активности ферментов, необходимых для синтеза гормона) <i>Effects on hormone synthesis (for example, changes in the expression or activity of enzymes necessary for hormone synthesis)</i>	Перхлорат-ион препятствует синтезу гормонов щитовидной железы, ингибируя поглощение йодида через натрий-йодный симпортер тироцитов <i>Perchlorate-ion directly interferes with thyroid hormone synthesis by inhibiting iodide uptake through the human sodium-iodide symporter on thyrocytes</i>
Влияние на транспорт гормонов через клеточные мембраны (например, нарушение внутриклеточного транспорта или секреции гормона) <i>Alteration of hormone transport across cell membranes (for example, impairment of intracellular transport or hormone secretion)</i>	Низкие дозы бисфенола А снижают высвобождение инсулина из везикул β -клеток островков Лангерганса <i>Low doses of Bisphenol A reduce insulin secretion from the vesicles of pancreatic islet β-cells</i>
Влияние на уровень циркулирующих гормонов (например, на уровень белков-переносчиков или связывание с белками плазмы) <i>Influence on the levels of circulating hormones (e.g., through carrier protein levels or plasma protein binding)</i>	Диэтилстильбэстрол (ДЭС) увеличивает уровень глобулина, связывающего половые гормоны, и тем самым уменьшает уровень половых гормонов (лютеинизирующий, фолликулостимулирующий, тиреотропный гормоны и др.) <i>Diethylstilbestrol (DES) increases circulating levels of sex hormone-binding globulin, thus decreasing the levels of sex hormones (luteinising hormone, thyroid-stimulating hormone, follicle-stimulating hormone, etc.)</i>
Влияние на метаболизм и клиренс гормонов <i>Effects on hormone metabolism and clearance</i>	Внутриутробное воздействие ДЭС является причиной сдвига в метаболизме эстрогенов у женщин <i>Prenatal exposure to DES causes a shift in oestrogen metabolism in women</i>
Влияние на структуру и организацию тканей (например, изменение клеточной пролиферации, миграции, влияние на дифференцировку клеток, индукция апоптоза) <i>Effects on tissue structure and organisation (for example, changes to cell proliferation and migration, influence on cell differentiation, induction of apoptosis)</i>	У самок мышей, подвергшихся воздействию оксибензона во время беременности и лактации, наблюдали увеличение пролиферации эпителиальных клеток молочной железы <i>Female mice exposed to oxybenzone during pregnancy and lactation demonstrated an increase in mammary epithelial cell proliferation</i>

Таблица 2. Примеры лекарственных препаратов, влияющих на эндокринную систему (по S. Sabir и соавт. [19], с изменениями)

Table 2. Examples of medicinal products affecting the endocrine system (adapted from S. Sabir et al. [19])

Международное непатентованное название <i>International non-proprietary name</i>	Фармакотерапевтическая группа <i>Pharmacotherapeutic group</i>	Известные негативные эффекты <i>Known negative effects</i>
Функции щитовидной железы / <i>Thyroid function</i>		
Амиодарон <i>Amiodarone</i>	Антиаритмическое средство <i>Anti-arrhythmic agents</i>	Гипотиреоз, являющийся следствием ингибирования поглощения йода фолликулярными клетками <i>Hypothyroidism through inhibiting of iodine uptake by follicular cells</i>
Интерлейкин-2 <i>Interleukin-2</i>	Цитокин <i>Cytokines</i>	Гипотиреоз, являющийся следствием повышенного уровня антитироглобулина и антитиреоидных микросомальных антител <i>Hypothyroidism due to elevated levels of antithyroglobulin and antithyroid microsomal antibodies</i>
Сунитиниб <i>Sunitinib</i>	Противоопухолевое средство – ингибитор протеинтирозинкиназы <i>Antineoplastic agents, protein tyrosine kinase inhibitors</i>	Тиреоидит, являющийся следствием апоптоза фолликулярных клеток <i>Thyroiditis through follicular cell apoptosis</i>
Алемтузумаб <i>Alemtuzumab</i>	Селективный иммунодепрессант <i>Selective immunosuppressants</i>	Гипертиреоз, являющийся следствием активации аутоиммунных механизмов <i>Hyperthyroidism due to autoimmune mechanisms activation</i>
Половая функция / <i>Sexual function</i>		
Вальпроевая кислота <i>Valproic acid</i>	Противоэпилептическое средство <i>Anti-epileptics</i>	Прямое токсическое действие на ткани яичек, приводит к эректильной дисфункции, нарушению морфологии сперматозоидов, их подвижности <i>Direct toxic effect on testicular tissues, leading to erectile dysfunction, abnormal sperm morphology and reduced motility</i>
Карбамазепин <i>Carbamazepine</i>	Противоэпилептическое средство <i>Anti-epileptics</i>	Увеличение синтеза глобулина, связывающего основные гормоны и снижение уровня половых гормонов <i>Increase in sex hormone-binding globulin synthesis and decrease in sex hormone levels</i>
Тамоксифен <i>Tamoxifen</i>	Противоопухолевое средство – антиэстроген <i>Antineoplastic agents, anti-oestrogens</i>	Снижает синтез и высвобождение лютеинизирующего гормона, блокирует рецептор эстрогена, особенно в гипоталамусе, что приводит к остановке овуляции <i>Decreases synthesis and release of luteinising hormone, blocks oestrogen receptors, especially in the hypothalamus, which inhibits ovulation</i>
Углеводно-липидный обмен / <i>Lipid and carbohydrate metabolism</i>		
Ставудин, зидовудин <i>Stavudin, Zidovudine</i>	Противовирусное [ВИЧ] средство <i>Antivirals for treatment of HIV infection</i>	Усиление процессов липолиза, что, в свою очередь, приводит к увеличению свободных жирных кислот в плазме и резистентности к инсулину <i>Enhances lipolysis processes responsible for increased plasma free fatty acids, leading to insulin resistance</i>
Ритонавир <i>Ritonavir</i>	Противовирусное [ВИЧ] средство <i>Antivirals for treatment of HIV infection</i>	
Интерферон альфа <i>Interferon alpha</i>	Цитокин <i>Cytokines</i>	Разрушение β -клеток поджелудочной железы в результате образования аутоантител <i>Destruction of pancreatic β-cells as a result of autoantibodies formation</i>
Хлорталидон <i>Chlorthalidone</i>	Диуретическое средство <i>Diuretics</i>	Повышенный уровень глюкозы в крови натощак, являющийся следствием гипокалиемии, что приводит к снижению секреции инсулина <i>Increased fasting blood glucose due to hypokalaemia, resulting in decreased insulin secretion</i>
Симвастатин, аторвастатин <i>Simvastatin, atorvastatin</i>	Гиполипидемическое средство – ингибитор ГМГ-КоА-редуктазы <i>Hypolipidemic agents, HMG-CoA reductase inhibitors</i>	Повышенная резистентность к инсулину и снижение экспрессии GLUT4 в адипоцитах <i>Increased insulin resistance and decreased glucose transporter-4 (GLUT-4) expression in adipocytes</i>
Клозапин <i>Clozapine</i>	Антипсихотическое средство (нейролептик) <i>Antipsychotic agents (neuroleptics)</i>	Ожирение, снижение действия инсулина <i>Obesity, decreased insulin action</i>
Пиоглитазон <i>Pioglitazone</i>	Гипогликемическое средство для перорального применения <i>Oral antihyperglycemic agents</i>	Ожирение, задержка жидкости <i>Obesity, fluid retention</i>

взаимодействие с ретиноидными рецепторами и др.).

Этап 3. Подтверждение механизмов *in vivo* (например, краткосрочные тесты на грызунах, позволяющие определить наличие эстрогеноподобных или андрогеноподобных свойств у тестируемого соединения)⁶.

Этап 4. Данные общетоксикологических исследований (токсичность при многократном введении в течение 28, 90 сут, канцерогенность, репродуктивная токсичность на одном поколении и др.).

Этап 5. Углубленные данные токсикологических исследований (расширенное исследование репродуктивной токсичности на одном поколении, репродуктивная токсичность для двух поколений)⁷.

Предложенная система не является обязательной стратегией тестирования. Цель такой системы тестирования фактически состоит в получении максимально возможной информации для корректной оценки эндокринных нарушений при попадании в организм химического вещества, используемого в различных областях экономической деятельности человека.

Исследования токсичности на животных, проводимые в соответствии со стандартными протоколами ОЭСР, предполагают биохимический, гематологический анализ крови, взвешивание органов, а также детальный гистопатологический анализ тканей, в том числе эндокринных желез. В ряде обновленных документов, например в протоколе ОЭСР «90-дневная токсичность на грызунах»⁸, кроме анализа стандартных клинико-лабораторных показателей обязательной является оценка уровней гормонов щитовидной железы трийодтиронина (Т3), тироксина (Т4) и тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови как индикаторов гормональной активности, а в качестве дополнительных параметров предлагается определять уровни половых гормонов (тестостерона, эстрадиола, фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ)) и спермограмму⁹.

Методические указания по оценке безопасности применения лекарственных средств (частный

случай химических веществ) в отношении эндокринной системы проработаны в меньшей степени. В 2015 г. FDA опубликовало руководство по доклинической оценке токсичности лекарственных средств в отношении эндокринной системы¹⁰. В руководстве подчеркивается, что на сегодняшний день не было обнаружено ни одного примера эндокринной токсичности, которую нельзя было бы идентифицировать с помощью стандартного перечня доклинических испытаний. Согласно данному руководству для оценки рисков потенциальной токсичности, связанной с нарушением функций эндокринной системы, рекомендуется следующий объем испытаний:

- предварительный скрининг возможности взаимодействия и связывания лекарственных субстанций с рецепторами, чувствительными к гормонам;
- фармакологические исследования (эндокринная активность тестируемого соединения может быть обнаружена в ходе экспериментов на моделях заболеваний человека, если фармакологическая мишень напрямую или косвенно затрагивает систему эндокринной регуляции);
- исследования токсичности при многократном введении на двух видах животных (грызунах и негрызунах);
- исследование репродуктивной токсичности;
- исследование канцерогенности.

В случае обнаружения негативных эффектов, связанных с нарушением функционирования эндокринной системы, требуются дополнительные исследования, направленные на поиск механизмов выявленного нарушения. Например, одним из механизмов негативного воздействия может являться изменение активности изоферментов семейства цитохрома P450 (CYP), поскольку некоторые из них (CYP 11A1, 11B1, 11B2, 17A1 и 21A1) участвуют в анаболизме и катаболизме стероидных гормонов. Аналогично уридин-5-дифосфат глюкуронилтрансфераза в печени метаболизирует гормоны щитовидной железы¹¹.

Уровни гормонов в крови животных как индикаторы гормональных нарушений

В стандартных доклинических исследованиях безопасности лекарственных средств влияние

⁶ Test No. 440: Uterotrophic bioassay in rodents: a short-term screening test for oestrogenic properties. Paris: OECD; 2007.

Test No. 441: Hershberger bioassay in rats: a short-term screening assay for (anti)androgenic properties. Paris: OECD; 2009.

⁷ Test No. 443: Extended one-generation reproductive toxicity study. Paris: OECD; 2018.

Test No. 416: Two-generation reproduction toxicity study. Paris: OECD; 2018.

⁸ Test No. 408: Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. Paris: OECD; 2018.

⁹ Там же.

¹⁰ Nonclinical evaluation of endocrine-related drug toxicity. Guidance for industry. CDER; 2015.

¹¹ Там же.

на эндокринную систему оценивают в первую очередь путем гистологического исследования эндокринных желез. Однако даже отсутствие микроскопических изменений ткани не всегда отражает функциональные нарушения в работе эндокринной системы. В этой связи важным элементом комплексной оценки эндокринных нарушений может служить определение уровня ключевых гормонов в крови животных в исследованиях общей токсичности при многократном введении или при изучении репродуктивной токсичности.

Выделяют три основные вертикальные оси гормональной регуляции, работающие по принципу обратной связи: тиреотропная ось (гипоталамус – гипофиз – щитовидная железа), гонадотропная ось (гипоталамус – гипофиз – гонады), кортикотропная ось (гипоталамус – гипофиз – кора надпочечников). Все оси по отдельности и во взаимосвязи формируют систему регуляции функций организма. Важным следствием этого взаимодействия является то, что изменения, индуцированные в одной эндокринной оси, вероятно, приведут к изменениям в других.

В доклинических исследованиях используют животных, у которых интактный гормональный фон может отличаться от гормонального фона человека, поэтому важно знать нормальные значения уровней отдельных гормонов для разных видов животных. Ниже представлены литературные данные, а также данные, полученные авторами статьи в рутинных исследованиях АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (табл. 3).

Следует отметить, что оценка только уровня того или иного биохимического маркера с позиции нормы или выхода за пределы нормальных значений не всегда является достаточной. Так, например, в качестве основных маркеров при оценке гормонального статуса щитовидной железы в течение длительного времени использовали уровни ТТГ совместно с Т4 (свободная фракция тироксина). Однако в настоящее время наблюдается тенденция к использованию показателей, изменение которых происходит на ранних сроках биологических нарушений, поэтому дополнительно к определению абсолютных значений уровней гормонов ТТГ, Т4 рекомендуется определение уровня Т3 (свободные фракции трийодтиронина), что позволяет рассчитать интегральный тиреоидный индекс (ИТИ), представляющий собой отношение суммы гормонов щитовидной железы к тиреотропному гормону и для клинически здорового человека в норме составляющий 7,04–27,21 [46]. Изменение этого

индекса является наиболее ранним маркером развития дисфункции щитовидной железы: повышение ИТИ свидетельствует о гипертиреозе, снижение ИТИ – о начальных стадиях гипотиреоза. Другим показателем, отражающим функцию щитовидной железы и действие гормонов на ткани, является отношение Т3/Т4, которое позволяет диагностировать состояния тиреотоксикоза, синдрома эутиреоидной слабости, влияния терапии и действия различных препаратов на функцию щитовидной железы [46–48].

На основании данных литературы и данных, полученных в результате собственных исследований, необходимо отметить, что у животных уровень ТТГ намного ниже, чем у человека, тогда как уровни Т3 и Т4 сравнимы (табл. 3). Поэтому, вероятно, расчет соотношения Т3/Т4 может быть более информативным маркером для контроля эндокринных нарушений в работе щитовидной железы при изучении токсичности или активности лекарственных средств.

Согласно лабораторным исследованиям, у крыс-самцов выше циркулирующие уровни Т4 и ТТГ, чем у самок крыс. Уровни Т3 и Т4 у крыс с возрастом снижаются [23]. Линии крыс различаются по наличию генетических особенностей и заболеваний, однако необходимо отметить, что у крыс довольно часто обнаруживают эутиреоидный синдром и спонтанно возникающие доброкачественные опухоли щитовидной железы без каких-либо клинических признаков [23, 49]. Такие особенности необходимо учитывать при интерпретации результатов, получаемых для этого вида лабораторных животных.

При анализе уровней гормонов гонадотропной оси исследователь может сталкиваться с большой вариабельностью данных, особенно у самок (табл. 3). Диагностическое значение имеет соотношение гормонов ЛГ/ФСГ. Так, у человека в детском возрасте оба гормона вырабатываются в соотношении 1:1. После начала полового созревания концентрация ЛГ становится больше, чем ФСГ. К завершению полового созревания и до начала климактерического периода показатель ФСГ стабильно меньше ЛГ в 1,5–2 раза. Значение ЛГ/ФСГ > 2,5 может свидетельствовать о развитии заболеваний яичников. Показатели ФСГ и ЛГ у мужчин достаточно стабильны, уровень ФСГ всегда немного выше уровня ЛГ [50, 51]. Аналогичные соотношения ЛГ/ФСГ характерны для карликовых свиней.

Ключевым фактором, определяющим степень достоверности и клинической значимости получаемых результатов, будет являться выбор вида

Таблица 3. Содержание некоторых гормонов основных вертикальных осей гормональной регуляции у человека и лабораторных животных

Table 3. Levels of selected hormones of the main vertical endocrine regulation axes in humans and laboratory animals

Гормон <i>Hormone</i>	Человек ¹² <i>Humans</i> ¹²		Крысы <i>Rats</i>	Кролики <i>Rabbits</i>	Карликовые свиньи <i>Mini pigs</i>
	мужчины <i>males</i>	женщины <i>females</i>			
Тиреотропная ось <i>Thyrotropic axis</i>					
Тиреотропный гормон (ТТГ), мМЕ/л <i>Thyroid-stimulating hormone</i> <i>(TSH), mU/L</i>	0,3–5,0		0,07–0,10 [20]	0,56–0,70 [41]	≤ 0.03 0,01–0,38 [22]
Трийодтиронин (Т3) нмоль/л <i>Triiodothyronine (T3), nM/L</i>	1,2–3,1		6,1–7,2 [20] 0,38–1,53 [23]	2,3–2,7 [21] 1,7–2,1 [41]	1,3–2,7 4,1–98,7 [22]
Тироксин (Т4), нмоль/л <i>Thyroxine (T4), nM/L</i>	39–155		44,1–51,5 45,3–61,0 [20] 37,5–87,5 [23]	23,8–51,3 [21]; 52,4–72,0 [41]	Самцы / <i>Males</i> : 35–43 43–356 [22] Самки / <i>Females</i> : 30–89 17–243 [22]
Гонадотропная ось <i>Gonadotropic axis</i>					
Тестостерон, нмоль/л <i>Testosterone, nM/L</i>	4,5–35,4 ¹³	0–3,1	Самцы / <i>Males</i> : 0.64–21.20 ; 4,0–16,5 [24]; Самки / <i>Females</i> : 0,94–3,47 [25, 26]	Самцы / <i>Males</i> : 0,04–0,45 [27]; 50,6–56,2 [28]; Самки / <i>Females</i> : 0,08–0,14 [29]	Самцы / <i>Males</i> : 4.4–27.8 ; 5,1–25,2 [30]
Эстрадиол, пг/мл <i>Estradiol, pg/mL</i>	30–68 ¹⁴	28–178 (фол. ф. / <i>FPh</i>); 51–549 (овул. / <i>OV</i>); 33,6–251 (лют. ф. / <i>LPh</i>); 18,4–64,0 (мен. п. / <i>MNP</i>)	Самцы / <i>Males</i> : 37,2–43,4 [34] Самки / <i>Females</i> : 47–191 ; 40–115 [31]; 71–158 [32; 33]	Самки / <i>Females</i> : 408–564 [28]	Самки / <i>Females</i> : 29–85 30–90 [35]
Прогестерон, нмоль/л <i>Progesterone, nM/L</i>	0,5–6,0 ¹⁵	0,5–6,0 (фол. ф., мен. п. / <i>FPh, MNP</i>) 10–94 (лют. ф. / <i>LPh</i>)	18,7–21,3 [36]	4,6–10,0 [37]	66,8–270,0 [35]; 63,6–175,0 [38]
Фолликулостимулирующий гормон, нг/мл <i>Follicle-stimulating hormone,</i> <i>ng/mL</i>	0,05–0,55 ¹⁶	0,07–0,68 (фол. ф. и лют. ф. / <i>FPh & LPh</i>) 0,26–1,04 (овул. / <i>OV</i>) 1,04–6,78 (мен. п. / <i>MNP</i>)	Самцы / <i>Males</i> : 8,6–12,2 Самки / <i>Females</i> : 4,0–7,0 [39]	1,1–5,5 [40]	Самцы / <i>Males</i> : 1,1–4,5 Самки / <i>Females</i> : 1,5–7,2 ; 2,0–5,4 [42]
Лютеинизирующий гормон, нг/мл <i>Luteinising hormone, ng/mL</i>	0,13–2,00 ¹⁷	0,13–2,34 (фол. и лют. фазы / <i>FPh & LPh</i>) 1,75–12,90 (овул. / <i>OV</i>) 2,61–13,4 (мен. п. / <i>MNP</i>)	Самцы / <i>Males</i> : 0,3–0,5 Самки / <i>Females</i> : 0,1–0,5 [39]	0,55–1,40 [40]	Самцы / <i>Males</i> : 0.64–3.10 ; Самки / <i>Females</i> : 1,2–7.8 2,3–3,5 [42]

¹² Северин СЕ, ред. Биохимия: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.

¹³ Тестостерон-ИФА-Бест. № X-3972. Инструкция по применению. АО «Вектор-Бест». Новосибирск; 2012.

¹⁴ Estradiol ELISA. Ref EAI-2693. Instructions for use. Version 14.0. DRG Instruments GmbH. Marburg; 2016.

¹⁵ Прогестерон-ИФА-Бест. № X-3978. Инструкция по применению. АО «Вектор-Бест». Новосибирск; 2015.

¹⁶ ФСГ-ИФА-Бест. № X-3974. Инструкция по применению. АО «Вектор-Бест». Новосибирск; 2012.

¹⁷ ЛГ-ИФА-Бест. № X-3976. Инструкция по применению. АО «Вектор-Бест». Новосибирск; 2017.

Продолжение таблицы 3

Table 3 (continued)

Гормон <i>Hormone</i>	Человек <i>Humans</i>		Крысы <i>Rats</i>	Кролики <i>Rabbits</i>	Карликовые свиньи <i>Mini Pigs</i>
	мужчины <i>males</i>	женщины <i>females</i>			
Кортикотропная ось <i>Corticotropic axis</i>					
Адренокортикотропный гормон, пг/мл <i>Adrenocorticotrophic hormone, pg/mL</i>	6–76		Самцы / <i>Males</i> : 83–162 6,3–12,7 Самки / <i>Females</i> : 12,0–7,0 [43]	95–165 [44]	90–170 [45]
Кортизол, нмоль/л <i>Cortisol, nM/L</i>	138–635 (утро / <i>morning</i>) 82–441 (вечер / <i>evening</i>)		65–106 26,6–44,0 [46]	22–27 (утро / <i>morning</i>) до / <i>up to</i> 38 (вечер / <i>evening</i>) [47]	Самцы / <i>Males</i> : 25–33; Самки / <i>Females</i> : 14,1–18,5 [48]
Кортикостерон, нмоль/л <i>Corticosterone, nM/L</i>	3,8–66,5		Самцы / <i>Males</i> : 197–1205 655–855 Самки / <i>Females</i> : 258–387 ; 1015–1415 [23]	252–284 ; 59–73 [44]	Нет данных <i>No data</i>

Примечание. Нормы могут иметь некоторые отличия в зависимости от метода анализа и используемого ИФА-набора. Нормы по содержанию гормонов гонадотропной оси в сыворотке крови человека приведены согласно инструкциям к ИФА-наборам.

Собственные данные выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Определение концентрации гормонов выполнено иммуноферментным методом (ИФА) с использованием наборов производства: 1) ООО «Вектор-Бест» (Россия): Тестостерон-ИФА-Бест (№ X-3972), Прогестерон-ИФА-Бест (№ X-3978), ТТГ-Люмо-Бест (№ X-3912), Т3 общий-ИФА-БЕСТ (№ X-3954), Т4 общий-ИФА-БЕСТ (№ X-3956), Кортизол-ИФА-Бест (№ X-3964); 2) «IBL International» (Германия): ELISA kit 'Corticosterone: Human, Rat, Mouse' (№ RE52211); 3) «Cloud-Clone Corp.» (США): ELISA Kit for Luteinising Hormone (LH), Porcine (№ CEA441Po); ELISA Kit for Follicle-Stimulating Hormone (FSH), Porcine (№ CEA830Po); 4) «DRG Instruments GmbH» (Германия): Oestradiol ELISA (№ EIA-2693); 5) «MyBioSource» (США): Rat ACTH ELISA kit (MBS2502683).

Условные обозначения: фол. ф. — фолликулярная фаза, лют. ф. — лютеиновая фаза, овул. — овуляция, мен. п. — менопауза.

Note. Reference values may differ slightly depending on the analysis method and the ELISA kit used. Reference values for gonadotropic axis hormones in human serum correspond to ELISA kits' instructions for use.

Authors' own data are bold and underlined. The hormone concentrations were determined by enzyme immunoassays (EIA) using kits manufactured by 1) Vector-Best (Russia): Testosterone-EIA-Best (No. X-3972), Progesterone-EIA-Best (No. X-3978), TSH-Lumo-Best (No. X-3912), T3 total-EIA-BEST (No. X-3954), T4 total-EIA-BEST (No. X-3956), Cortisol-IFA-Best (No. X-3964); 2) IBL International (Germany): ELISA kit 'Corticosterone: Human, Rat, Mouse' (No. RE52211); 3) Cloud-Clone Corp. (USA): ELISA Kit for Luteinising Hormone (LH), Porcine (No. CEA441Po); ELISA Kit for Follicle-Stimulating Hormone (FSH), Porcine (No. CEA830Po); 4) DRG Instruments GmbH (Germany): Oestradiol ELISA (No. EIA-2693); 5) MyBioSource (USA): Rat ACTH ELISA Kit (MBS2502683).

Abbreviations: FPh — follicular phase, LPh — luteal phase, OV — ovulation, MNP — menopause.

используемых лабораторных животных в соответствии с задачами исследования. Например, оценку динамики изменения уровней половых (эстрадиол, прогестерон) и гонадотропных гормонов (ФСГ, ЛГ) рекомендуется проводить на карликовых свиньях, так как продолжительность эстрального цикла у этих животных (18–24 сут) наиболее близка к менструальному циклу женщин. Кроме того, соотношение фолликулярной и лютеиновой фазы у свиней по продолжительности близко к таковому, наблюдаемому у женщин [52].

Мыши и крысы являются общепринятым видом животных, использующихся для изучения стресса. Основным гормоном стресса у этих животных в отличие от человека является кортикостерон [53, 54]. Уровень этого гормона зависит

от различных факторов: времени суток [53], времени года [55], поведенческой активности животных [54, 56–59] и др. Ритм суточной секреции кортикостерона (аналогично кортизолу у человека) надпочечниками имеет «пульсирующий характер» и характеризуется низким уровнем гормонов в начале биологической ночи (время засыпания), резким подъемом к середине биологической ночи, достижением максимума к моменту пробуждения и постепенным снижением гормонального уровня до момента начала нового суточного цикла [55].

V. Viau и M.J. Meaney [58] было установлено, что в отсутствие стрессовых факторов влияние эстрального цикла на концентрацию кортикостерона в плазме крыс-самок статистически

незначимо. Поведенческая активность животных влияет на концентрацию кортикостерона. У высокоактивных крыс-самцов (прогностически устойчивых в условиях стрессорного напряжения) концентрация кортикостерона в плазме крови составила 755 ± 100 нмоль/л, у пассивных (предрасположенных к стрессу) – 1215 ± 225 нмоль/л [56]. Влияние сезонного фактора на уровень кортикостерона в крови отмечалось в работе А.А. Гостюхиной и соавт. [57]. В осенне-зимний период среднесуточная концентрация кортикостерона в крови крыс минимальна. Осенью она составляет 41–66 нмоль/л, зимой – 69–116 нмоль/л, затем возрастает к весеннему периоду до 537–574 нмоль/л и в течение лета остается в среднем на уровне 115–173 нмоль/л.

При оценке уровня гормонов кортикотропной оси и интерпретации результатов необходимо учитывать все вышеперечисленные факторы, а также наличие/отсутствие стресс-факторов, связанных в том числе с забором крови. Для оценки влияния лекарственных средств на гормоны кортикотропной оси выбор определяемого показателя обусловлен видом лабораторных животных, например у крыс и мышей оценивают концентрацию кортикостерона, у карликовых свиней и кроликов – кортизола.

Заключение

К настоящему времени накоплено значительное количество данных о негативном влиянии химических веществ, в том числе лекарственных средств, на эндокринную систему. Вопросы прогнозирования влияния экзогенных соединений на эндокринную систему становятся все более актуальными наравне с оценкой канцерогенных или генотоксических свойств. Учитывая разнообразие механизмов, посредством которых

ЭД способны нарушать гормональную регуляцию, а также нелинейность зависимости «доза–эффект», необходима всесторонняя экспериментальная оценка рисков подобных изменений. Международные регуляторные требования и методические подходы к тестированию безопасности химических веществ и лекарственных средств относительно эндокринной системы относятся на этапе формирования и развития.

Не вызывает сомнения и необходимость разработки национальных практических рекомендаций/руководств. На сегодняшний день в рамках доклинической оценки безопасности лекарственных средств не уделяется должное внимание этим вопросам. Предлагается включить измерение уровней основных гормонов в биологических жидкостях в протоколы оценки общей и специфической токсичности как ранних индикаторов гормональных нарушений, возникающих еще до развития структурных изменений тканей и органов. При планировании таких исследований необходимо учитывать видовые особенности гормональной регуляции. При этом биологическое разнообразие животных моделей позволит увеличить прогностическую ценность получаемых результатов. Очевидным становится важность создания внутрилабораторных норм (референтных интервалов) не только отдельных гормонов, но и их соотношений у разных видов животных, используемых в экспериментах.

Таким образом, включение в традиционные регистрационные доклинические исследования анализа уровней основных гормонов у животных позволило бы оценить риски потенциальных угроз ятрогенного происхождения без значительного увеличения стоимости самих исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. La Merrill MA, Vandenberg LN, Smith MT, Goodson W, Browne P, Patisaul HB, et al. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(1):45–57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
2. Lathers CM. Endocrine disruptors: a new scientific role for clinical pharmacologists? Impact on human health, wildlife, and the environment. *J Clin Pharm*. 2002;42(1):7–23. <https://doi.org/10.1177/0091270002042001001>
3. Carson RL. *Silent spring*. Boston: Houghton Mifflin Co.; 1962.
4. Соловьева ТА. «Безмолвная весна» Рэйчел Карсон и революция в общественном экологическом сознании XX века. В кн.: *Человек, экология, культура: Современные практики и проблемы*. Сборник научных трудов по материалам Международной молодежной научной конференции. Саратов; 2014. С. 206–11. [Solovyeva TA. Rachel Carson's "Silent spring" and a revolution in public environmental awareness in the 20th century. In: *Human, ecology, culture: modern practices and problems*. Proceedings of the International Youth Scientific Conference. Saratov; 2014. P. 206–11 (In Russ.)]
5. Cohn BA, La Merrill M, Krigbaum NY, Yeh G, Park JS, Zimmermann L, Cirillo PM. DDT exposure in utero and breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(8):2865–72. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1841>
6. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent

- generations. *Endocrinology*. 2006;147(6 Suppl):11–7. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1164>
7. McLachlan JA, Newbold RR, Shah HC, Hogan MD, Dixon RL. Reduced fertility in female mice exposed transplacentally to diethylstilbestrol (DES). *Fertil Steril*. 1982;38(3):364–71. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)46520-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)46520-9)
8. Newbold RR, McLachlan JA. Vaginal adenosis and adenocarcinoma in mice exposed prenatally or neonatally to diethylstilbestrol. *Cancer Res*. 1982;42(5):2003–11. PMID: 7066910
9. Galbiati V, Buoso E, d'Emmanuele R, di Villa Bianca R, Di Paola R, Morroni F, et al. Immune and nervous systems interaction in endocrine disruptors toxicity: the case of atrazine. *Front Toxicol*. 2021;3:4. <https://doi.org/10.3389/ftox.2021.649024>
10. Яглова НВ, Яглов ВВ. Эндокринные дисрапторы – новое направление исследований в эндокринологии. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012;67(3):56–61. [Yaglova NV, Yaglov VV. Endocrine disruptors are a novel direction of endocrinologic scientific investigation. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2012;67(3):56–61 (In Russ.)]
11. Patisaul HB, Adewale HB. Long-term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behavior. *Front Behav Neurosci*. 2009;3:10. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.010.2009>
12. Евтеева АА, Шеремета МС, Пигарова ЕА. Эндокринные дисрапторы в патогенезе таких социально значимых заболеваний, как сахарный диабет, злокачественные новообразования, сердечно-сосудистые заболевания, патология репродуктивной системы. *Ожирение и метаболизм*. 2021;18(3):327–35. [Evtееva AA, Sheremeta MS, Pigarova EA. Endocrine disruptors in the pathogenesis of socially significant diseases such as diabetes mellitus, malignant neoplasms, cardiovascular diseases, pathology of the reproductive system. *Ozhirenie i metabolism = Obesity and Metabolism*. 2021;18(3):327–35 (In Russ.)] <https://doi.org/10.14341/omet12757>
13. Lauretta R, Sansone A, Sansone M, Romanelli F, Appetecchia M. Endocrine disrupting chemicals: effects on endocrine glands. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:178. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00178>
14. Andersen ME, Conolly RB, Faustman EM, Kavlock RJ, Portier CJ, Sheehan DM, et al. Quantitative mechanistically based dose-response modeling with endocrine-active compounds. *Environ Health Perspect*. 1999;107(Suppl 4):631–8. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s4631>
15. Sheehan DM. No-threshold dose–response curves for nongenotoxic chemicals: findings and applications for risk assessment. *Environ Res*. 2006;100(1):93–9. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.09.002>
16. Vandenberg LN, Wadia PR, Schaeberle CM, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. The mammary gland response to estradiol: monotonic at the cellular level, non-monotonic at the tissue-level of organization? *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;101(4–5):263–74. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.06.028>
17. Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ Jr, et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect*. 1996;104(Suppl 4):741–803. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s4741>
18. Robboy SJ, Szyfelbein WM, Goellner JR, Kaufman RH, Taft PD, Richard RM, et al. Dysplasia and cytologic findings in 4,589 young women enrolled in diethylstilbestrol-adenosis (DESAD) project. *Am J Obstet Gynecol*. 1981;140(5):579–86. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(81\)90236-2](https://doi.org/10.1016/0002-9378(81)90236-2)
19. Sabir S, Akhtar MF, Saleem A. Endocrine disruption as an adverse effect of non-endocrine targeting pharmaceuticals. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;26(2):1277–86. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3774-4>
20. Сандаков ДБ, Семененя ИН, Гуринов АВ. Изменение содержания некоторых гормонов в крови у крыс при центральном действии ингибиторов протеолиза и белкового синтеза. *Проблемы эндокринологии*. 1997;43(4):46–7. [Sandakov DB, Semeneya IN, Gurin AV. The change in the content of certain hormones in the blood of rats under the central action of proteolysis inhibitors and protein synthesis. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*. 1997;43(4):46–7 (In Russ.)] <https://doi.org/10.14341/probl199743446-47>
21. Joseph LJ, Desai KB, Patel MC, Mehta MN, Ganatra RD. Thyroid function and thyrotropin levels in rabbits immunized to produce antibodies against thyroid hormones. *Int J Rad Appl Instrum B*. 1987;14(5):511–4. [https://doi.org/10.1016/0883-2897\(87\)90119-x](https://doi.org/10.1016/0883-2897(87)90119-x)
22. Yeom SC, Cho SY, Park CG, Lee WJ. Analysis of reference interval and age-related changes in serum biochemistry and hematology in the specific pathogen free miniature pig. *Lab Anim Res*. 2012;28(4):245–53. <https://doi.org/10.5625/lar.2012.28.4.245>
23. Thorson L. Thyroid diseases in rodent species. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 2014;17(1):51–67. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2013.09.002>
24. Диатроптов МЕ, Диатроптова МА, Кондашевская МВ. Анализ показателей инфрадианных ритмов стероидных гормонов и процентного содержания нейтрофилов периферической крови у крыс-самцов Вистар. *Фундаментальные исследования*. 2012;(9-2):273–7. [Diatroptov ME, Diatrop-tova MA, Kondashevskaya MV. Infradian rhythmic of the steroid hormones and peripheral blood's neutrophils percentage test in Wistar male rats. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*. 2012;(9-2):273–7 (In Russ.)]
25. Кассим М, Синдеева ОА, Синдеев СС, Зинченко ЕМ, Уланова МВ, Гекалюк АС и др. Влияние эмоциональных и тяжелых патологических стрессов на уровень артериального давления и продукцию тестостерона у самок и самцов крыс. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология*. 2015;15(2):46–53. [Kas-sim M, Sindeeva OA, Sindeev SS, Zinchenko EM, Ulanova MV, Gekalyuk AS, et al. The effect of emotional and severe pathological stresses on the level of arterial pressure and the production of testosterone in female and male rats. *Izvestiya Saratovskogo*

- universiteta. Novaya seriya. Seriya Khimiya. Biologiya. Ekologiya = Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology. 2015;15(2):46–53 (In Russ.))
26. Косырева АМ, Джалилова ДШ, Макарова ОВ, Сладкопечевцев АС. Морфофункциональные изменения тимуса и содержание субпопуляций лимфоцитов в крови у самок крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии при системном воспалительном ответе. *Медицинская иммунология*. 2019;21(4):643–52. [Kosyreva AM, Dzhaliilova DSh, Makarova OV, Sladkopevtsev AS. Morpho-functional changes of thymus and contents of blood lymphocyte subpopulations in female Wistar rats with different resistance to hypoxia in systemic inflammatory response. *Medical Immunology (Russia)*. 2019;21(4):643–52 (In Russ.)) <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-4-643-652>
 27. Hilliard J, Pang CN, Penardi R, Sawyer CH. Effect of coitus on serum levels of testosterone and LH in male and female rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1975;149(4):1010–4. <https://doi.org/10.3181/00379727-149-38945>
 28. Zaima U, Anas Sarwar Q, Sarmad R, Misbah I, Tanzeela F, Saqib U. Effects of oral administration of black seed (*Nigella sativa*) oil on histomorphometric dynamics of testes and testosterone profile in rabbits. *Pak J Pharm Sci*. 2017;30(2):531–6. PMID: 28649080
 29. Котлярова АА, Шулькин АВ, Черных ИВ, Якушева ЕН. Особенности кроликов породы Шиншилла как тест-системы для изучения препаратов половых гормонов. *Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина*. Рязань; 2018. С. 63–4. [Kotlyarova AA, Shchul'kin AV, Chernykh IV, Yakusheva EN. Special considerations for Chinchilla rabbits as a test system for studying sex hormone preparations. *Proceedings of the All-Russian scientific conference of young scientists dedicated to the 95th anniversary of the birth of Professor A.A. Nikulin*. Ryazan; 2018. P. 63–4 (In Russ.))
 30. Myren CJ, Einer-Jensen N, Bennett P. The physiology of the testes in the Göttingen mini pig. *Z Versuchstierkd*. 1989;32(4):183–7. PMID: 2626885
 31. Faccio LA, Da Silva AS, Tonin AA. Serum levels of LH, FSH, estradiol and progesterone in female rats experimentally infected by *Trypanosoma evansi*. *Experimental Parasitology*. 2013;135(1):110–5. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.008>
 32. Mukaddam-Daher S, Jankowski M, Wang D, Menouar A, Gutkowska J. Regulation of cardiac oxytocin system and natriuretic peptide during rat gestation and postpartum. *J Endocrinol*. 2002;175(1):211–6. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1750211>
 33. Røste LS, Taubøll E, Isojarvi JIT, Berner A, Berg KA, Pakarinen AJ, et al. Gonadal morphology and sex hormones in male and female Wistar rats after long-term lamotrigine treatment. *Seizure*. 2003;12(8):621–7. [https://doi.org/10.1016/s1059-1311\(03\)00056-6](https://doi.org/10.1016/s1059-1311(03)00056-6)
 34. Мхитаров ВА. Влияние длительного потребления алкоголя в условиях свободного выбора на уровень половых гормонов. *Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова*. 2010;18(1):44–8. [Mkhitarov VA. Effect of prolonged alcohol consumption in a free elections in the level of sex hormones. *Rossiysky mediko-biologicheskyy vestnik im. akademika I. P. Pavlova* = I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald. 2010;18(1):44–8 (In Russ.))
 35. Peter B, De Rijk EPCT, Zeltner A, Emmen HH. Sexual maturation in the female Göttingen minipig. *Toxicol Pathol*. 2016;44(3):482–5. <https://doi.org/10.1177/0192623315621413>
 36. Meijs-Roelofs HM, de Greef WJ, Uilenbroek JT. Plasma progesterone and its relationship to serum gonadotrophins in immature female rats. *J Endocrinol*. 1975;64(2):329–36. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0640329>
 37. Kriesten K, Murawski U. Concentrations of serum cortisol, progesterone, estradiol-17 beta, cholesterol and cholesterol ester in the doe during the reproductive stadium, in the fetal serum, in the amniotic fluid and in the milk of rabbits, as well as correlations between these parameters. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1988;90(3):413–20. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(88\)90211-3](https://doi.org/10.1016/0300-9629(88)90211-3)
 38. Noguchi M, Ikeda T, Kawaguchi H, Tanimoto A. Estrus synchronization in micro-minipig using estradiol dipropionate and prostaglandin F2α. *J Reprod Dev*. 2016;62(4):373–8. <https://doi.org/10.1262/jrd.2015-169>
 39. Gharib SD, Wierman ME, Badger TM, Chin WW. Sex steroid hormone regulation of follicle-stimulating hormone subunit messenger ribonucleic acid (mRNA) levels in the rat. *J Clin Invest*. 1987;80(2):294–9. <https://doi.org/10.1172/JCI113072>
 40. Berger M, Jean-Faucher C, de Turckheim M, Veysiere G, Blanc MR, Poirier JC, Jean C. Testosterone, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in plasma of rabbit from birth to adulthood. Correlation with sexual and behavioural development. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1982;99(3):459–65. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0990459>
 41. Шулькин АВ, Якушева ЕН, Черных ИВ, Виноградов ИЮ, Попова НМ. Экспрессия гликопротеина Р при экспериментальной дисфункции щитовидной железы. *Клиническая и экспериментальная тиреология*. 2015;11(3):11–6. [Shchul'kin AV, Yakusheva EN, Chernykh IV, Vinogradov IYu, Popova NM. P-glycoprotein expression in experimental thyroid dysfunction. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya tireoidologiya* = *Clinical and Experimental Thyroidology*. 2015;11(3):11–6 (In Russ.)) <https://doi.org/10.14341/kt2015311-16>
 42. Noguchi M, Miura N, Ando T, Kubota Ch, Hobo S, Kawaguchi H, Tanimoto A. Profiles of reproductive hormone in the microminipig during the normal estrous cycle. *In Vivo*. 2015;29(1):17–22.
 43. Pitt JA, Buckalew AR, House DE, Abbott BD. Adrenocorticotropin (ACTH) and corticosterone secretion by perfused pituitary and adrenal glands from rodents exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicology*. 2000;151(1–3):25–35. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00257-2](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00257-2)
 44. Monnier M, Desbals B. Dosage radio-immunologique de l'ACTH chez le lapin: relations stress ACTH-corticostéroïdes et diarrhées. *Reprod Nutr Dev*. 1985;25(6):1017–28. PMID: 3006192

45. Tuchscherer M, Kanitz E, Puppe B, Tuchscherer A. Altered immunomodulation by glucocorticoids in neonatal pigs exposed to a psychosocial stressor. *Pediatr Res*. 2010;68(6):473–8. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e3181f70f08>
46. Горенко ИН, Киприянова КЕ, Типисова ЕВ. Тиреоидные гормоны и уровень антител у здоровых жителей Архангельской области. *Экология человека*. 2018;25(9):36–41. [Gorenko IN, Kipriyanova KE, Tipisova EV. Thyroid hormones and antibody level in healthy residents of the Arkhangelsk region. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*. 2018;25(9):36–41 (In Russ.)) <https://doi.org/10.33396/1728-0869-2018-9-36-41>
47. Mortoglou A, Candiloros H. The serum triiodothyronine to thyroxine (T3/T4) ratio in various thyroid disorders and after Levothyroxine replacement therapy. *Hormones (Athens)*. 2004;3(2):120–6. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.11120>
48. Гончаров НП. Значение и роль методов определения гормонов в развитии эндокринологии как общепромологической науки. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012;67(3):42–9. [Goncharov NP. Significance and role of hormone detection methods in the development of endocrinology as a biological discipline. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2012;67(3):42–9 (In Russ.)) <https://doi.org/10.15690/vramn.v67i3.184>
49. Campanha FVG, Perone D, de Campos DHS, Luvizotto R, De Sıbio MT, et al. Thyroxine increases Serca2 and Ryr2 gene expression in heart failure rats with euthyroid sick syndrome. *Arch Endocrinol Metab*. 2016;60(6):582–6. <https://doi.org/10.1590/2359-3997000000208>
50. Saadia Z. Follicle stimulating hormone (LH: FSH) ratio in polycystic ovary syndrome (PCOS) – obese vs. non-obese women. *Med Arch*. 2020;74(4):289–93. <https://doi.org/10.5455/medarch.2020.74.289-293>
51. Morshed MS, Banu H, Akhtar N, Sultana T, Begum A, Zamilla M. Luteinizing hormone to follicle-stimulating hormone ratio significantly correlates with androgen level and manifestations are more frequent with hyperandrogenemia in women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Metab*. 2021;11(1):14–21. <https://doi.org/10.14740/jem716>
52. Bode G, Clausing P, Gervais F, Loegsted J, Luft J, Nogues V, Sims J. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010;62(3):196–220. <https://doi.org/10.1016/j.yascn.2010.05.009>
53. Черкасова ОП, Федоров ВИ. Одновременное исследование содержания кортикостерона и 11-дегидрокортикостерона в надпочечниках и плазме крови при остром стрессе. *Проблемы эндокринологии*. 2001;47(1):37–9. [Cherkasova OP, Fedorov VI. Simultaneous measurement of corticosterone and 11-dehydrocorticosterone in the adrenals and plasma in acute stress. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*. 2001;47(1):37–9 (In Russ.)) <https://doi.org/10.14341/probl11315>
54. Кондашевская МВ, Алексанкина ВВ, Артемьева КА, Болтовская МН. Сопоставление адаптивной способности старых и молодых крыс Вистар к стрессорному воздействию и острой гипоксической гипоксии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021;171(6):783–7. [Kondashevskaya MV, Aleksankina VV, Artemieva KA, Boltovskaya MN. Comparison adaptive capacity of old and young Wistar rats to stress exposure and acute hypoxic hypoxia. *Byulleten' ehksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021;171(6):783–7 (In Russ.)) <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-171-6-783-787>
55. Меркулов ВМ, Климова НВ, Меркулова ТИ. Внутрисуточный ритм секреции глюкокортикоидов и динамика генного ответа. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(2):214–21. [Merkulov VM, Klimova NV, Merkulova TI. The ultradian rhythm of glucocorticoid secretion and the time course of target gene regulation. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(2):214–21 (In Russ.))
56. Умрюхин ПЕ, Григорчук ОС. Кортикостерон крови и ликвора у крыс с различным поведением в открытом поле при стрессорной нагрузке. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015;11(3):372–4. [Umryukhin PE, Grigorchuk OS. Blood and liquor corticosterone level in the rats with different open field behavior: effects of the stress. *Mezhdunarodny zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2015;11(3):372–4 (In Russ.))
57. Гостюхина АА, Замощина ТА, Зайцев КВ, Гутор СС, Жукова ОБ, Светлик МВ и др. Адаптивные реакции крыс после световых десинхронозов и физического переутомления. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018;17(3):22–34. [Gostyukhina AA, Zamoshchina TA, Zaitsev KV, Gutor SS, Zhukova OB, Svetlik MV, et al. Adaptive reactions of rats after light desynchronization and physical overwork. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018;17(3):22–34 (In Russ.)) <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-22-34>
58. Viau V, Meaney MJ. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology*. 1991;129(5):2503–11. <https://doi.org/10.1210/endo-129-5-2503>
59. Louch CD, Higginbotham M. The relation between social rank and plasma corticosterone levels in mice. *Gen Comp Endocrinol*. 1967;8(3):441–4. [https://doi.org/10.1016/s0016-6480\(67\)80006-6](https://doi.org/10.1016/s0016-6480(67)80006-6)

Вклад авторов. К.Л. Крышень — концепция, сбор, систематизация и обобщение данных, изложенных в нормативных и методических документах и литературе, написание текста рукописи; Н.М. Фаустова — сбор и систематизация экспериментальных данных, подготовка и доработка рукописи; М.Н. Макарова — идея исследования, критический пересмотр текста рукописи и иллюстративного материала, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; В.Г. Макаров — концепция исследования.

Благодарности. Работа выполнена как инициативное исследование без финансовой поддержки.

Конфликт интересов. М.Н. Макарова является членом редакционной коллегии журнала «Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. Kirill L. Kryshen—elaboration of the study concept, collection, systematisation and consolidation of data from regulatory documents, guidelines and literature; writing of the text of the manuscript; Natalia M. Faustova—collection and systematisation of experimental data, preparation and finalisation of the manuscript; Marina N. Makarova—elaboration of the study idea, critical revision of the text and illustrative material, approval of the final version of the manuscript for publication; Valery G. Makarov— elaboration of the study concept.

Acknowledgements. The work was performed as unsolicited independent research without financial support.

Conflict of interest. Marina N. Makarova is a member of the Editorial Board of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*, the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Крышень Кирилл Леонидович, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
kryshen.kl@doclinika.ru

Фаустова Наталья Михайловна, канд. хим. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>
faustova.nm@doclinika.ru

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
makarova.mn@doclinika.ru

Макаров Валерий Геннадиевич, д-р мед. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>
makarov.vg@doclinika.ru

Kirill L. Kryshen, Cand. Sci. (Biol).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
kryshen.kl@doclinika.ru

Natalia M. Faustova, Cand. Sci. (Chem.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>
faustova.nm@doclinika.ru

Marina N. Makarova, Dr. Sci (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
makarova.mn@doclinika.ru

Valery G. Makarov, Dr. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>
makarov.vg@doclinika.ru

Статья поступила 28.10.2021

После доработки 21.01.2022

Принята к печати 07.06.2022

Online first 30.06.2022

Article was received 28 October 2021

Revised 21 January 2022

Accepted for publication 07 June 2022

Online first 30.06.2022



О.В. Верле 
А.Г. Сиреканян 
Н.В. Елисеева 
Ю.В. Лифанова 
А.А. Спасов 
О.В. Островский 

Влияние нового каппа-агониста (фторфенилпроизводное имидазо[1,2-*a*]бензимидазола) на геном крыс

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, пл. Павших Борцов, д. 1, Волгоград, 400131, Российская Федерация

✉ Лифанова Юлия Викторовна; j_semenova_pharm@mail.ru

РЕЗЮМЕ

В качестве перспективной группы веществ для создания опиоидных анальгетиков с оригинальным механизмом действия без риска развития респираторной депрессии и наркотической зависимости рассматриваются каппа-селективные агонисты. В предыдущих исследованиях было выявлено соединение РУ-1205 (фторфенилпроизводное имидазо[1,2-*a*]бензимидазола) с установленным в экспериментах *in vitro* и *in vivo* каппа-рецепторным механизмом анальгетической активности.

Цель работы: оценка влияния дигидрохлорида 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазола на уровень повреждений ДНК у крыс при однократном подкожном введении.

Материалы и методы: исследование выполнено на половозрелых белых беспородных лабораторных крысах обоего пола. Повреждения ДНК учитывали методом ДНК-комет. Использовалась схема с однократным подкожным введением водного раствора субстанции РУ-1205 в трех дозах: 1, 10 и 100 мг/кг. В качестве положительного контроля использовали метилметансульфонат в дозе 40 мг/кг внутривенно, в качестве отрицательного контроля – 0,9% раствор NaCl (100 мкл на 100 г массы животного).

Результаты: при однократном подкожном введении крысам РУ-1205 дозозависимо не увеличивает показатель %ДНК в хвостах комет. Изменения не носят достоверного характера по сравнению с состоянием генома клеток соответствующих органов/тканей животных, получавших в эти же сроки физиологический раствор. %ДНК в хвостах комет в клетках различных органов/тканей в группах животных отрицательного контроля составляет 1,83–3,82% (медианное значение [25–75%]). Введение генотоксиканта метилметансульфоната в дозе 40 мг/кг приводит к увеличению количества поврежденной ДНК по сравнению с группой отрицательного контроля во всех исследуемых органах и тканях.

Выводы: в результате исследования генотоксических свойств дигидрохлорида 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазола установлено, что при однократном подкожном введении крысам в дозах 1, 10, 100 мг/кг РУ-1205 не оказывает повреждающего действия на геном клеток исследуемых органов.

Ключевые слова: повреждение ДНК; метод ДНК-комет; каппа-опиоидные агонисты; производные бензимидазола; анальгетики; доклинические исследования

Для цитирования: Верле О.В., Сиреканян А.Г., Елисеева Н.В., Лифанова Ю.В., Спасов А.А., Островский О.В. Влияние нового каппа-агониста (фторфенилпроизводное имидазо[1,2-*a*]бензимидазола) на геном крыс. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(1):42–50. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-1-42-50>

O.V. Verle 
A.G. Sirekanyan 
N.V. Eliseeva 
Yu.V. Lifanova 
A.A. Spasov 
O.V. Ostrovskij 

Effects of a New Kappa Agonist (Fluorophenyl Derivative of Imidazo[1,2-*a*]benzimidazole) on the Rat Genome

Volgograd State Medical University,
1 Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd 400131, Russian Federation

✉ Yuliya V. Lifanova; j_semenova_pharm@mail.ru

ABSTRACT

Selective kappa-opioid receptor (KOR) agonists are considered a promising group of substances for developing opioid analgesics characterised with an original mechanism of action without the risk of respiratory depression and drug addiction. Previous studies identified a fluorophenyl derivative of imidazo[1,2-*a*]benzimidazole (RU-1205) with a KOR-based mechanism of analgesic action established in *in vitro* and *in vivo* experiments.

The aim of the study was to assess the effect of 9-(2-morpholinoethyl)-2-(4-fluorophenyl)imidazo[1,2-*a*]benzimidazole dihydrochloride on the level of DNA damage in rats after a single subcutaneous injection.

Materials and methods. The study was conducted in adult white outbred laboratory rats of both sexes. DNA damage was estimated using the comet assay. The study involved a single subcutaneous injection of an aqueous solution of RU-1205 in three doses: 1, 10, and 100 mg/kg. The authors used intraperitoneal methyl methanesulfonate (40 mg per kg of animal body weight) as a positive control and 0.9% NaCl (100 µL per 100 g of animal body weight) as a negative control.

Results. A single subcutaneous injection of RU-1205 to rats did not produce a significant dose-dependent increase in % tail DNA when compared with the state of the corresponding organ/tissue cell genome in negative control animals after normal saline administration at the same time points. In the negative control groups, % tail DNA in cells of various organs/tissues ranged from 1.83% to 3.82% (median values [25–75%]). On the contrary, the administration of 40 mg/kg of genotoxic methyl methanesulfonate led to an increase in damaged DNA in all studied organs and tissues when compared with negative control animals.

Conclusions. The study of 9-(2-morpholinoethyl)-2-(4-fluorophenyl)imidazo[1,2-*a*]benzimidazole dihydrochloride genotoxicity demonstrated that a single subcutaneous injection of 1, 10, or 100 mg/kg of RU-1205 to rats did not damage the cell genome of the studied organs.

Key words: DNA damage; comet assay; kappa-opioid receptor agonists; benzimidazole derivatives; analgesics; preclinical studies

For citation: Verle O.V., Sirekanyan A.G., Eliseeva N.V., Lifanova Yu.V., Spasov A.A., Ostrovskij O.V. Effects of a new kappa agonist (fluorophenyl derivative of imidazo[1,2-*a*]benzimidazole) on the rat genome. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):42–50. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-1-42-50>

Введение

Этиологическая и патогенетическая роль индуцированного мутагенеза для организма человека не вызывает сомнений. Генотоксические поражения рассматриваются не только как причина наследственной и онкологической патологий, но и как общий фактор, играющий существенную роль в этиопатологии большого спектра заболеваний: от сердечно-сосудистых и нейродегенеративных до проблем бесплодия и старения. Наиболее конструктивным способом защиты организма человека от последствий мутагенеза, вызванного действием различных

химических веществ, представляется предупреждение контакта человека с потенциальными генотоксикантами. Это определяет необходимость тщательного контроля за распространением потенциальных генотоксикантов, в том числе среди лекарственных средств как группы соединений, направленно и регулярно используемых человеком [1].

Одной из наиболее актуальных в современной медицине продолжает оставаться проблема медикаментозного обезбоживания и разработки новых эффективных анальгетиков с минимальным риском побочных эффектов. Перспективной

группой веществ для создания опиоидных анальгетиков с оригинальным механизмом действия без риска развития респираторной депрессии и наркотической зависимости являются каппа-селективные агонисты [2]. В предыдущих исследованиях *in vitro* и *in vivo* было выявлено соединение РУ-1205 (фторфенилпроизводное имидазо[1,2-а]бензимидазола) с экспериментально установленным каппа-рецепторным механизмом анальгетической активности [3–5].

Производные бензимидазола характеризуются широким спектром фармакологической активности. Так, например, некоторые производные бензимидазолов могут быть активны в отношении топоизомеразы I, ингибируя ее с последующей остановкой репликации ДНК [6]. Поэтому, несмотря на выявленный механизм анальгетической активности соединения РУ-1205, оценка генотоксичности является неотъемлемым элементом в системе доклинических исследований безопасности этого препарата.

Из имеющихся на сегодняшний день в арсенале генотоксикологии методов исследования наиболее перспективным представляется метод гель-электрофореза единичных клеток, или метод ДНК-комет *in vivo*¹. Метод основан на регистрации различной подвижности в постоянном электрическом поле поврежденной ДНК и (или) фрагментов ДНК индивидуальных лизированных клеток, заключенных в агарозный гель. ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, визуально напоминающий «хвост кометы», параметры которого зависят от степени поврежденности ДНК² [1, 7]. К преимуществам кометного анализа относятся его применимость к различным тканям и (или) особым типам клеток, его высокая чувствительность к обнаружению повреждения ДНК, достаточность небольшого количества клеток в образце, общая простота выполнения теста, короткое время, необходимое для завершения исследования, и его относительно низкая стоимость.

Цель работы — оценка влияния дигидрохлорида 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а]бензимидазола на уровень поврежденного ДНК у крыс при однократном подкожном введении.

Материалы и методы

Объектом исследования являлось соединение РУ-1205 (дигидрохлорид 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а]бензимидазол) в виде субстанции, синтезированной в Научно-исследовательском институте физической и органической химии Южного федерального университета.

Исследование *in vivo* выполнено на 45 половозрелых белых беспородных лабораторных крысах обоего пола массой 210–240 г, полученных из питомника ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАН (Ленинградская обл., д. Рапполово). Животные до начала эксперимента подверглись адаптационному карантину в течение 14 сут в виварии кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Животных содержали группами по 5 особей при регулируемом совмещенном световом режиме (12/12 ч) и температуре 20–22 °С. За 12 ч до эксперимента животных лишали еды при свободном доступе к воде³.

Животные случайным образом были разделены на 9 групп — 2 группы отрицательного контроля, получавшие растворитель 0,9% раствор NaCl в объеме 100 мкл на 100 г массы животного отдельно для группы самок и самцов, 1 группа положительного контроля, получавшая модельный генотоксикант — мутаген прямого действия — метилметансульфонат в дозе 40 мг/кг внутривентриально за 4 ч до эвтаназии, и 6 экспериментальных (по 3 группы самок и самцов), получавших РУ-1205 в различной дозировке. Ввиду отсутствия на момент исследования данных о наличии/отсутствии существенных межполовых различий в токсических эффектах исследуемого соединения эксперименты проводили на животных обоего пола, опираясь при этом на методические рекомендации⁴. В данном тесте использовалась схема с однократным подкожным введением водного раствора субстанции РУ-1205 в трех дозах, установленных в ранее проведенных исследованиях: 1 мг/кг (терапевтически эффективная доза), 10 мг/кг (промежуточная доза, превышающая терапевтическую в 10 раз) и 100 мг/кг (условно токсическая, превышающая терапевтическую дозу в 100 раз)

¹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*: методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2010.
² Дурнев АД. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. М.; 2006.
³ Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union. 2010. L 276/33–79. <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>
⁴ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

[3–5]. Введение раствора соединения проводили за 22 ч до эвтаназии животных, учитывая данные по фармакокинетике РУ-1205 и полагаясь на руководство OECD Test. No 489⁵. По данным литературы [8], достоверных различий относительно генотоксичности метилметансульфоната в группах крыс-самцов и крыс-самок не наблюдается, поэтому раздельных групп по половому признаку для групп положительного контроля предусмотрено не было.

На основании данных о фармакодинамике, фармакокинетике РУ-1205 и методическим рекомендациям⁶ [3–5] для исследования были выбраны следующие органы и ткани:

- печень, являющаяся основным органом биотрансформации ксенобиотиков и обладающая высокой чувствительностью к действию мутагенов и канцерогенов (на основании ранее проведенных исследований РУ-1205 и расчета абсолютных величин тканевой доступности было отмечено значительное содержание соединения в тканях печени и его активный метаболизм);
- головной мозг — как орган потенциального действия соединения — анальгетика центрального действия (РУ-1205 проникает через гематоэнцефалический барьер и определяется в течение 4 ч в тканях мозга);
- костный мозг — как активно пролиферирующая ткань, высокочувствительная к действию мутагенов, канцерогенов;
- клетки крови, осуществляющие транспорт ксенобиотиков.

Эвтаназию животных осуществляли методом цервикальной дислокации. Исследования методом ДНК-комет проводили в соответствии с методикой, описанной в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств⁷, протоколе 14.2 [9, 10], рекомендациях работ [11–14]. Эксперимент включал в себя следующие этапы: выделение единичных клеток из тканей животных, приготовление геля-слайдов, лизис клеток с последующей инкубацией в щелочном растворе, электрофорез, обработка образцов микропрепаратов, окрашивание микропрепаратов и микроскопический анализ.

По окончании электрофореза микропрепараты фиксировали в 70% растворе этилового спирта (время фиксации 10 мин). После фиксации

микропрепараты окрашивали в темноте флуоресцирующим красителем SYBR Green I в соответствии с вышеперечисленными протоколами.

Анализ проводили на флуоресцентном микроскопе с последующей фиксацией изображений цифровым фотоаппаратом SMART Camera NX300 (Samsung). Анализ параметров ДНК-комет — с помощью программы Comet Score (TriTek Corp.)⁸. Случайным образом анализировали состояние ДНК в каждом микропрепарате не менее 100 клеток. В качестве показателя генотоксичности использовали статистически достоверное увеличение процентного содержания ДНК в хвостах комет (%ДНК в хвостах комет) с последующим расчетом индекса повреждения (ИП):

$$\text{ИП} = \frac{\% \text{ДНК в хвостах комет в опытной группе}}{\% \text{ДНК в хвостах комет в контрольной группе}}.$$

При ИП > 2 тестируемый образец может обладать генотоксическими свойствами [7].

В связи с выраженной асимметрией распределения клеток по величине «%ДНК в хвостах комет» данные по каждому стеклу предварительно представляли в логарифмическом масштабе, а после усреднения по 100 клеткам выполняли обратное преобразование [15, 16]. Статистическая обработка данных выполнена с помощью теста Краскела–Уоллиса (непараметрический вариант ANOVA) с последующими множественными сравнениями по Бонферрони–Данну (пакет программ Statistica).

Результаты и обсуждение

Для учета качественных результатов принято деление анализируемых клеток, мигрирующих под действием электрического поля, на клетки без повреждения и с разной степенью выраженности повреждения ДНК. Клетки без повреждения генетического материала под флуоресцентным микроскопом выглядят как ярко светящиеся точки (рис. 1d), клетки с поврежденной ДНК представляют собой образования, визуально напоминающие кометы (рис. 1e). В анализ не включали апоптотические клетки, выявленные на микропрепаратах в виде слабо флуоресцирующих ДНК-комет с широким диффузным «хвостом» и практически отсутствующей «головой».

⁵ OECD Test No. 489: *In vivo* mammalian alkaline comet assay. OECD Guideline for the testing of chemicals. OECD/OCDE; 2014.

⁶ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

⁷ Там же.

⁸ Comet Scoring Software. Version 2.0.0.38. TriTek Corp. <http://rexhooover.com/>

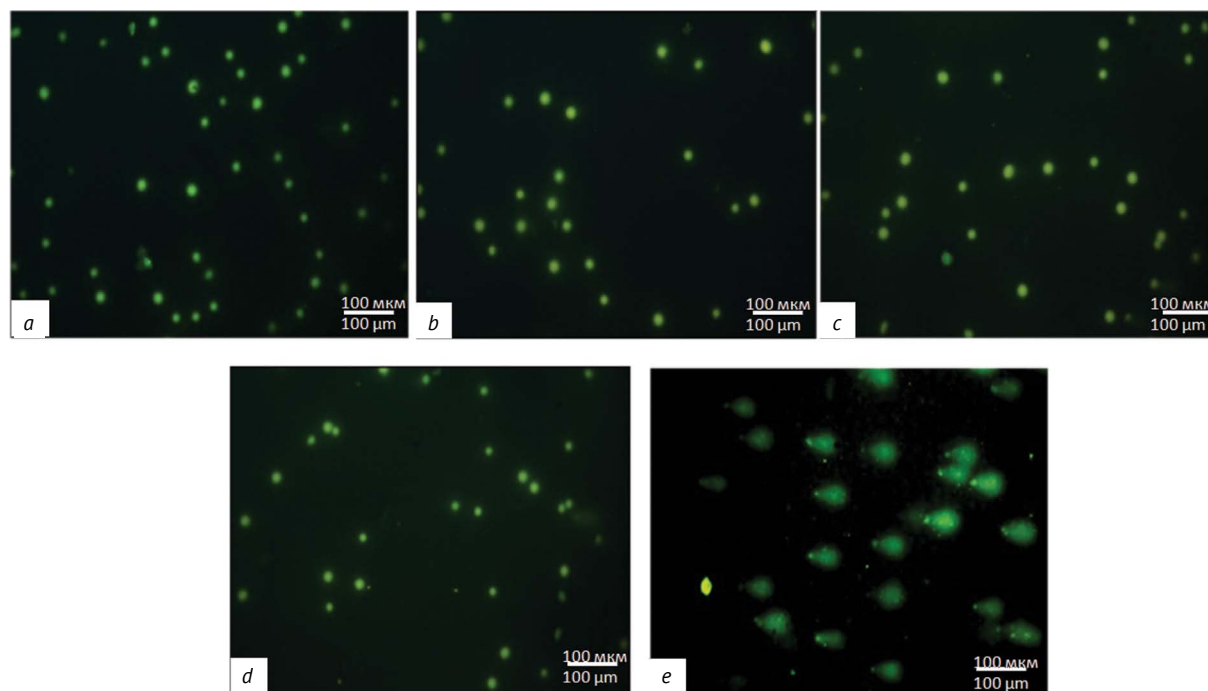


Рис. 1. Изображения ДНК-комет клеток печени крыс (окраска SYBR Green I), мигрирующих под действием электрического поля, при введении: а – РУ-1205, 1 мг/кг; б – РУ-1205, 10 мг/кг; в – РУ-1205, 100 мг/кг; д – физиологического раствора; е – метилметансульфоната, 40 мг/кг.

Fig. 1. Images of electric field-induced migration of comet DNA in rat liver cells (stained with SYBR Green I) after injection of а, RU-1205 (1 mg/kg); б, RU-1205 (10 mg/kg); в, RU-1205 (100 mg/kg); д, normal saline; or е, methyl methanesulfonate (40 mg/kg).

Распределение животных по значению параметра %ДНК в хвостах комет в клетках разных тканей и органов отличалось от нормального распределения (по критерию Шапиро–Уилка), поэтому в результатах приведены значения медианы – Ме, 25 и 75 перцентилей (Ме [25–75%]), а для визуализации результатов использовали графики типа «ящик-усы». Критерием наличия генотоксических свойств у РУ-1205 может являться статистически достоверное дозозависимое увеличение показателя поврежденности ДНК или статистически достоверный, воспроизводимый эффект по крайней мере для одной экспериментальной точки (исследуемой дозы РУ-1205).

Метилметансульфонат как вещество положительного контроля в дозе 40 мг/кг приводил к существенному увеличению %ДНК в хвосте комет по сравнению с контрольной группой животных (отрицательный контроль, физиологический раствор) во всех исследуемых органах/тканях (рис. 2). Индекс повреждения для всех видов органов и тканей превышал 2,0, что подтверждает повреждающее геном действие метилметансульфоната. Так, индекс повреждения для клеток печени составил 8,4, костного мозга – 5,2, крови – 2,7, головного мозга – 8,7. Во всех экспериментах наблюда-

лись высокие показатели коэффициента вариативности (CV, %), минимальный составляет 21,4% (образцы крови), а максимальный 80,7% (образцы тканей печени), что говорит о сильной вариативности внутри выборки.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о правильности выполнения аналитической части исследования: манипуляций, связанных с выделением единичных клеток, приготовлением микропрепаратов, проведением электрофореза, а также о возможности регистрации повреждений ДНК, в том числе и в результате воздействия на лабораторных животных РУ-1205.

Для животных из группы отрицательного контроля, получавших физиологический раствор, выявлено, что %ДНК в хвостах комет в клетках различных органов/тканей составил: в печени 2,14% [2,14–2,23%] и 1,96% [1,69–2,21%], в костном мозге 2,71% [2,52–3,05%] и 3,66% [2,62–4,06%], в клетках крови 3,10% [2,88–3,8%] и 3,82% [3,05–3,97%], в головном мозге 2,03% [7,77–2,04%] и 1,83% [1,48–1,89%] для самцов и самок соответственно (Ме [25–75%]) (рис. 2). Однократное подкожное введение РУ-1205 дозозависимо не увеличивало показатель %ДНК в хвостах комет (рис. 1а–с, рис. 2). Изменения

не носили достоверного характера по сравнению с состоянием генома клеток соответствующих органов/тканей у животных, получавших в эти же сроки физиологический раствор (отрицательный контроль).

Влияние производных бензимидазола на геном неоднократно описано в научной литературе [17, 18]. Более того, многие дериваты бензимидазолов способны ускорять апоптоз,

что также показано в целом ряде исследований (см., например, [18]). В случае с РУ-1205 в дозе 100 мг/кг, которая превышает среднюю эффективную дозу в 100 раз, эффектов обнаружено не было. Наоборот, в нескольких группах отмечено достоверное снижение %ДНК в хвостах комет (рис. 2), однако это не может рассматриваться как признак специфической токсичности (наличие генотоксических свойств). Об отсутствии

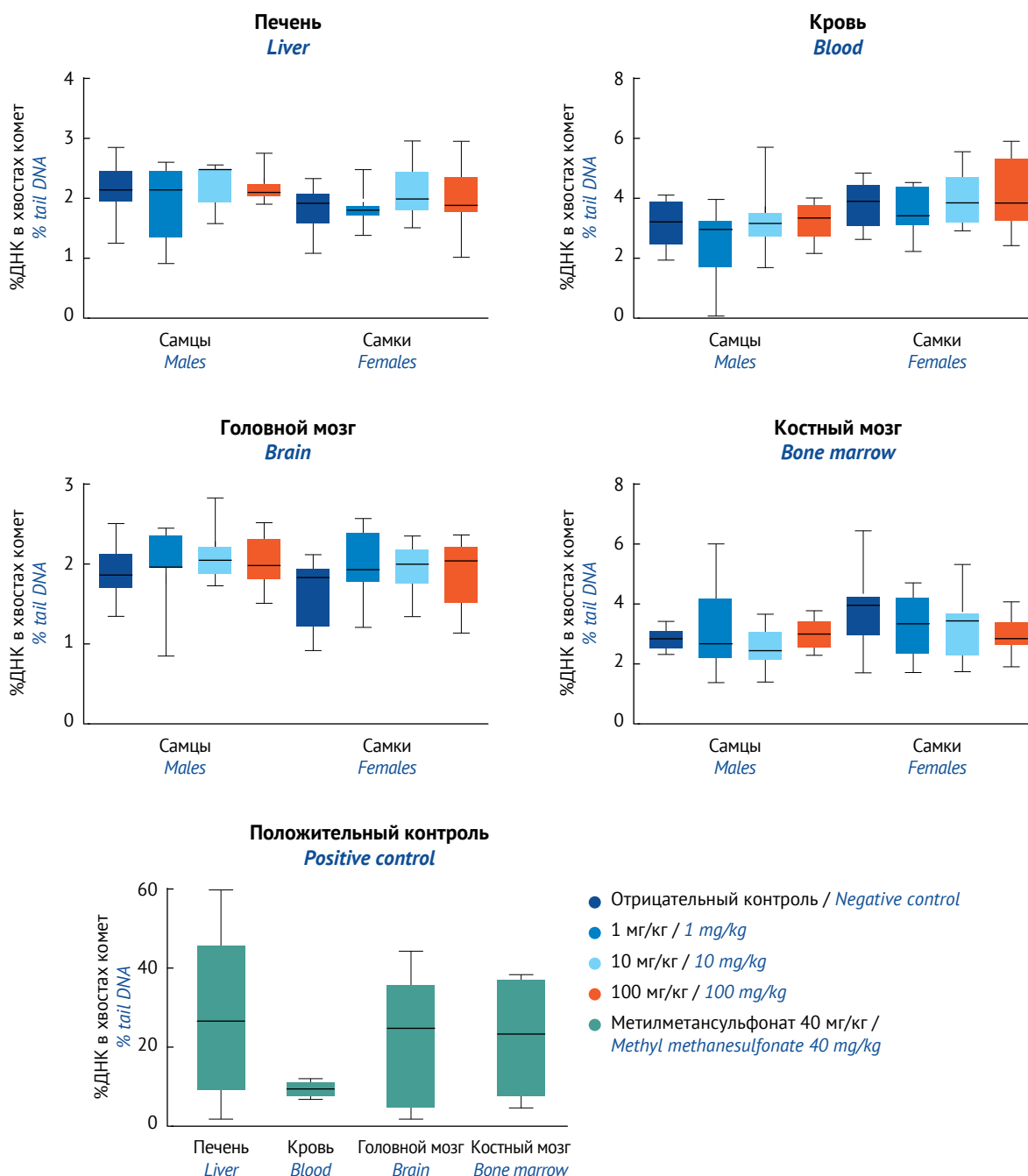


Рис. 2. Влияние РУ-1205 и метилметансульфоната на уровень повреждений ДНК в клетках органов/тканей крыс.

Fig. 2. Influence of RU-1205 and methyl methanesulfonate on the level of DNA damage in rat tissue/organ cells.

Таблица 1. Распределение индекса повреждения ДНК для органов/тканей крыс при подкожном введении РУ-1205 в различных дозах**Table 1.** DNA damage index distribution for rat organs/tissues after subcutaneous administration of RU-1205 in different doses

Исследуемые органы <i>Investigated organs</i>	Индекс повреждения ДНК <i>DNA damage index</i>					
	Самцы <i>Males</i>			Самки <i>Females</i>		
	1 мг/кг <i>1 mg/kg</i>	10 мг/кг <i>10 mg/kg</i>	100 мг/кг <i>100 mg/kg</i>	1 мг/кг <i>1 mg/kg</i>	10 мг/кг <i>10 mg/kg</i>	100 мг/кг <i>100 mg/kg</i>
Печень <i>Liver</i>	0,89	1,07	1,00	0,89	1,07	1,00
Костный мозг <i>Bone marrow</i>	1,04	0,87	1,07	0,84	0,75	0,77
Кровь <i>Blood</i>	0,72	1,01	0,98	0,87	1,02	0,92
Головной мозг <i>Brain</i>	1,05	1,08	1,06	1,16	1,12	1,15

генотоксических свойств также свидетельствует и низкий показатель индекса повреждения генома (табл. 1). Для всех органов и тканей данный показатель не превышал значение 2,0.

Заключение

В результате исследования влияния дигидрохлорида 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (РУ-1205) на параметры, определяемые в тесте ДНК-комет, установлено, что при однократном подкожном введении в дозах 1, 10, 100 мг/кг данное соединение не оказывало повреждающего дей-

ствия на геном клеток печени, крови, костного и головного мозга крыс, о чем свидетельствует отсутствие статистически достоверного дозозависимого увеличения показателя %ДНК в хвостах комет для всех экспериментальных точек и низкий уровень индекса повреждения в максимальной исследованной дозе 100 мг/кг, превышающей среднюю эффективную в 100 раз. Полученные данные позволяют судить о перспективах дальнейшей разработки данного соединения при создании инновационного анальгетика с безопасным фармакологическим профилем.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Жанатаев АК, Дурнев АД. Генотоксикология лекарственных средств: современное состояние и перспективы. *Медицинская генетика*. 2020;19(9):60–2. Zhanataev AK, Durnev AD. Genetic toxicology of pharmaceuticals: current state and perspectives. *Medical Genetics*. 2020;19(9):60–2 (In Russ.). <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2020.09.60-62>
- Paton KF, Atigari DV, Kaska S, Prisinzano T, Kivell BM. Strategies for developing κ opioid receptor agonists for the treatment of pain with fewer side effects. *J Pharmacol Exp Ther*. 2020;375(2):332–48. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000134>
- Спасов АА, Гречко ОЮ, Елисеева НВ, Анисимова ВА. Фторфенилпроизводные конденсированных бензимидазолов, селективные каппа-агонисты. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2010;73(5):83. Spasov AA, Grechko OYu, Eliseeva NV, Anisimova VA. Fluorophenyl derivatives of fused benzimidazoles, selective kappa agonists. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2010;73(5):83 (In Russ.).
- Spasov AA, Smirnova LA, Grechko OYu, Eliseeva NV, Rashchenko AI, Zhukowskaia ON, et al. Distribution, excretion and metabolic pathways of a single parenteral administration of kappa opioid receptor agonist RU-1205. *Res Results Pharmacol*. 2021;7(2):59–65. <https://doi.org/10.3897/rpharmacology.7.67261>
- Спасов АА, Смирнова ЛА, Гречко ОЮ, Елисеева НВ, Лифанова ЮВ, Ращенко АИ и др. Фармакокинетические свойства нового каппа-опиоидного анальгетика-соединения RU-1205 при однократном пероральном введении. *Фармация и фармакология*. 2021;9(2):149–60. Spasov AA, Smirnova LA, Grechko OYu, Eliseeva NV, Lifanova YuV, Rashchenko AI, et al. Pharmacokinetic properties of a new kappa-opioid analgesic RU-1205 compound at a single peroral administration. *Pharmacy and Pharmacology*. 2021;9(2):149–60 (In Russ.). <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2021-9-2-149-160>
- Kim JS, Sun Q, Gatto B, Yu C, Liu A, Liu LF, et al. Structure-activity relationships of benzimidazoles and related heterocycles as topoisomerase I poisons. *Bioorg Med Chem*. 1996;4(4):621–30. [https://doi.org/10.1016/0968-0896\(96\)00047-8](https://doi.org/10.1016/0968-0896(96)00047-8)
- Гайдай ЕА, Дорофеева АА, Крышень КЛ, Гайдай ДС. Методические аспекты проведения

- ДНК-комет-теста в условиях *in vivo* в доклинических исследованиях. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2020;(3):16–24.
- Gajdaj EA, Dorofeeva AA, Kryshen KL, Gajdaj DS. Methodological aspects of DNA-comet assay *in vivo* in pre-clinical research. *Laboratory Animals for Science*. 2020;(3):16–24 (In Russ.).
<https://doi.org/10.29296/2618723X-2020-03-03>
8. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1999;71:1–1554.
PMID: 10507919
 9. Uno Y, Kojima H, Omori T, Corvi R, Honma M, Schechtman LM, et al. JaCVAM-organized international validation study of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens: I. Summary of pre-validation study results. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;786–788:3–13.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.04.011>
 10. Uno Y, Kojima H, Omori T, Corvi R, Honma M, Schechtman LM, et al. JaCVAM-organized international validation study of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for detection of genotoxic carcinogens: II. Summary of definitive validation study results. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;786:45–76.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.04.010>
 11. Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutat Res*. 2007;627(1):31–5.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.011>
 12. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206–21.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(2000\)35:3%3C206::aid-em8%3E3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3%3C206::aid-em8%3E3.0.co;2-j)
 13. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. 2003;18(1):45–51.
<https://doi.org/10.1093/mutage/18.1.45>
 14. Koppen G, De Prins S, Jacobs A, Nelen V, Schoeters G, Langie SA. The comet assay in human biomonitoring: cryopreservation of whole blood and comparison with isolated mononuclear cells. *Mutagenesis*. 2018;33(1):41–7.
<https://doi.org/10.1093/mutage/gex034>
 15. Bright J, Aylott M, Bate S, Geys H, Jarvis P, Saul J, et al. Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay. *Pharm Stat*. 2011;10(6):485–93.
<https://doi.org/10.1002/pst.530>
 16. Wiklund SJ, Agurell E. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis*. 2003;18(2):167–75.
<https://doi.org/10.1093/mutage/18.2.167>
 17. Hegde M, Sharath Kumar KS, Thomas E, Ananda H, Raghavan SC, Rangappa KS. A novel benzimidazole derivative binds to the DNA minor groove and induces apoptosis in leukemic cells. *RSC Adv*. 2015;5(113):93194–208.
<https://doi.org/10.1039/c5ra16605e>
 18. Kamal A, Subba Rao AV, Lakshma Nayak VL, Subba Reddy NV, Swapna K, Ramakrishna G, et al. Synthesis and biological evaluation of imidazo[1,5-a]pyridine-benzimidazole hybrids as inhibitors of both tubulin polymerization and PI3K/Akt pathway. *Org Biomol Chem*. 2014;12(48):9864–80.
<https://doi.org/10.1039/c4ob01930j>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: О.В. Верле — проведение экспериментальной серии (микроскопия, оценка повреждающего действия исследуемого соединения), обработка полученных результатов, редактирование текста рукописи; А.Г. Сиреканян — проведение экспериментальной серии (выделение органов, проведение электрофореза), обработка полученных результатов; Н.В. Елисева — обработка полученных результатов, редактирование текста рукописи; Ю.В. Лифанова — проведение экспериментальной серии (работа с животными, введение исследуемого препарата), написание текста рукописи; А.А. Спасов — концепция и дизайн исследования, утверждение окончательного варианта рукописи; О.В. Островский — дизайн эксперимента и руководство научно-исследовательской работой, редактирование текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Olga V. Verle conducted experiments (microscopy and evaluation of the test compound's damaging effect), processed the obtained results, and revised the manuscript. Anna G. Sirekanyan conducted experiments (isolation of organs, electrophoresis) and processed the obtained results. Natalya V. Eliseeva processed the obtained results and revised the manuscript. Yuliya V. Lifanova conducted experiments (handling of animals, administration of the study drug) and drafted the manuscript. Alexander A. Spasov conceptualised and designed the study, approved the final version of the manuscript for publication. Oleg V. Ostrovskij designed the experiments, supervised the research, and edited the manuscript.

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено региональным исследовательским этическим комитетом Волгоградской области (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP), протокол № 2077-2018 от 30.10.2018).

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

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

Ethics approval. The study was approved by the Regional Research Ethics Committee of the Volgograd Region (IRB No. 00005839, IORG No. 0004900 (OHRP); minutes of meeting No. 2077-2018 of 30.10.2018).

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

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

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Верле Ольга Владимировна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0853-0148>
verle_olga@mail.ru

Сиреканян Анна Грагатовна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3794-9079>
annart888@yandex.ru

Елисеева Наталья Владимировна, канд. мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2243-5326>
nvkirillova@rambler.ru

Лифанова Юлия Викторовна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9663-5067>
j_semenova_pharm@mail.ru

Спасов Александр Алексеевич, академик РАН, д-р мед. наук, профессор.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7185-4826>
aspasov@mail.ru

Островский Олег Владимирович, д-р мед. наук, профессор.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9827-9545>
ol.ostr@gmail.com

Olga V. Verle.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0853-0148>
verle_olga@mail.ru

Anna G. Sirekanyan.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3794-9079>
annart888@yandex.ru

Natalya V. Eliseeva, Cand. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2243-5326>
nvkirillova@rambler.ru

Yuliya V. Lifanova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9663-5067>
j_semenova_pharm@mail.ru

Alexander A. Spasov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7185-4826>
aspasov@mail.ru

Oleg V. Ostrovskij, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9827-9545>
ol.ostr@gmail.com

Поступила 06.12.2022

После доработки 12.01.2023

Принята к публикации 07.03.2023

Received 6 December 2022

Revised 12 January 2023

Accepted 7 March 2023

УДК: 615.211:57.084.1

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-1-51-59>

Оригинальная статья | Original article



А.Ю. Гришина 
У.В. Шаркова 
Ю.И. Сысоев 
Д.Ю. Ивкин  
И.А. Никитина 
Н.А. Анисимова 
В.П. Ильницкий 
Е.И. Елецкая 
С.В. Оковитый 

Влияние антагонистов α_2 -адренорецепторов на характеристики электроэнцефалограмм кроликов при введении дексмедетомидина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
ул. Профессора Попова, 14, лит. А, Санкт-Петербург, 197376, Российская Федерация

✉ Ивкин Дмитрий Юрьевич; dmitry.ivkin@pharminnotech.com

РЕЗЮМЕ

Неотъемлемой частью надлежащей лабораторной практики является гуманное отношение к лабораторным животным. Актуальными остаются исследования по изучению анестезирующего действия различных препаратов, позволяющих снизить болевой синдром и дистресс у лабораторных животных.

Цель работы: оценка влияния α_2 -адреноблокаторов пророксана и атипабезола на изменение отношения индексов ритмов волн электроэнцефалограмм при введении дексмедетомидина.

Материалы и методы: в исследовании были использованы кролики-самцы линии Советская шиншилла массой $3,0 \pm 0,3$ кг ($n=12$). Дексмедетомидин вводили однократно подкожно в дозе 100 мкг/кг, атипабезол — 50 мкг/кг внутримышечно, пророксан — 170 мкг/кг внутривенно (дозы эквивалентны дозе дексмедетомидина). Действие препарата оценивали методом фармакоэлектроэнцефалографии. Запись электроэнцефалограмм животных осуществляли с помощью чашечковых электродов с использованием 8-канального энцефалографа «Нейрон-Спектр-1» с полосой пропускания 0,5–35 Гц и частотой квантования 500 Гц. Осуществляли проверку распределения количественных признаков с использованием *W*-критерия Шапиро–Уилка. При нормальном распределении количественных признаков значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с *post-hoc*-тестом по Даннетту; при распределении, отличном от нормального, — с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с *post-hoc*-тестом по Данну.

Результаты: в результате введения дексмедетомидина наблюдали достоверное увеличение δ -ритма и снижение θ -ритма головного мозга кроликов на протяжении 2 ч. Введение атипабезола в эквивалентных количествах возвращало соотношение индексов ритмов к исходным значениям, эквивалентное введение пророксана не влияло на соотношение индексов ритмов волн.

Выводы: атипабезол устраняет седативное и гипнотическое действие дексмедетомидина, что подтверждает возможность его применения в ветеринарной практике для вывода из наркоза. В свою очередь, применение пророксана с целью устранения седативного эффекта дексмедетомидина неэффективно.

Ключевые слова: дексмедетомидин; фармако-ЭЭГ; анестезия; седация; адренергические альфа-антагонисты; адренергические альфа-агонисты; доклинические исследования

Для цитирования: Гришина А.Ю., Шаркова У.В., Сысоев Ю.И., Ивкин Д.Ю., Никитина И.А., Анисимова Н.А., Ильницкий В.П., Елецкая Е.И., Оковитый С.В. Влияние антагонистов α_2 -адренорецепторов на характеристики электроэнцефалограмм кроликов при введении дексмедетомидина. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(1):51–59. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-1-51-59>

© А.Ю. Гришина, У.В. Шаркова, Ю.И. Сысоев, Д.Ю. Ивкин, И.А. Никитина, Н.А. Анисимова, В.П. Ильницкий, Е.И. Елецкая, С.В. Оковитый, 2023

A.Yu. Grishina 
U.V. Sharkova 
Yu.I. Sysoev 
D.Yu. Ivkin 
I.A. Nikitina 
N.A. Anisimova 
V.P. Il'nitskiy 
E.I. Eletskaia 
S.V. Okovityi 

Influence of α_2 -Adrenoreceptor Antagonists on Electroencephalogram Characteristics after Dexmedetomidine Administration in Rabbits

Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University,
14A Professor Popov St., St Petersburg 197376, Russian Federation

✉ Dmitry Yu. Ivkin; dmitry.ivkin@pharminnotech.com

ABSTRACT

The humane treatment of laboratory animals is an integral part of good laboratory practice. It remains relevant to study the anaesthetic effects of various medicinal products helping to reduce pain and distress in laboratory animals.

The aim of the study was to compare the effects of the α_2 blockers proroXan and atipamezole on changes in electroencephalogram rhythm index ratios after dexmedetomidine administration.

Materials and methods. The study used male Soviet chinchilla rabbits weighing 3.0 ± 0.3 kg ($n=12$). Study animals received single injections of 100 $\mu\text{g/kg}$ dexmedetomidine subcutaneously, 50 $\mu\text{g/kg}$ atipamezole intramuscularly, and 170 $\mu\text{g/kg}$ proroXan intravenously (equimolar to the dose of dexmedetomidine). The effects of these medicinal products were evaluated by pharmacoelectroencephalography. The authors recorded electroencephalograms using cup electrodes and a Neuro-Spectrum-1 8-channel encephalograph (Neurosoft, Russia) with a bandwidth of 0.5–35 Hz and a sampling frequency of 500 Hz. The distribution of quantitative characteristics was checked for normality using the Shapiro–Wilk W test. The authors used one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test to evaluate the significance of differences for the normal distribution of quantitative characteristics; they used the nonparametric Kruskal–Wallis test with Dunn's *post hoc* test for the non-normal one.

Results. Dexmedetomidine administration resulted in significant two-hour changes in the rabbit brain, and the authors observed an increase in the delta rhythm and a decrease in the theta rhythm. At equimolar doses, atipamezole returned the ratios of the wave rhythm indices to the baseline values, whereas proroXan had no effect on the ratios.

Conclusions. As demonstrated by the neutralisation of dexmedetomidine sedative and hypnotic effects, atipamezole can be used in veterinary for recovery from anaesthesia. ProroXan, on the contrary, is not effective in reversing the sedative effect of dexmedetomidine.

Key words: dexmedetomidine; pharmaco-EEG; anaesthesia; sedation; alpha-adrenoreceptor antagonists; alpha-adrenoreceptor agonists; non-clinical studies

For citation: Grishina A.Yu., Sharkova U.V., Sysoev Yu.I., Ivkin D.Yu., Nikitina I.A., Anisimova N.A., Il'nitskiy V.P., Eletskaia E.I., Okovityi S.V. Influence of α_2 -adrenoreceptor antagonists on electroencephalogram characteristics after dexmedetomidine administration in rabbits. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):51–59. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-1-51-59>

Введение

В настоящее время невозможно представить полноценный фармакологический или токсикологический эксперимент без использования лабораторных животных. При этом большое количество манипуляций возможно только под общей анестезией. Во избежание преждевременного пробуждения животного во время манипуляций применяют постоянный контроль их состояния. Воздействие анестезирующих препаратов

во время операции возможно оценить методом электроэнцефалографии (ЭЭГ) с системой фронтальных отведений [1]. Применение ЭЭГ в качестве метода мониторинга основывается на наблюдении, что все анестезирующие препараты изменяют синаптическую функцию [2].

Оценка глубины наркоза осуществляется тремя методами: биспектральный анализ, спектральная энтропия, анализ слуховых вызванных потенциалов. В состоянии седации на ЭЭГ

наблюдается преобладание низкочастотных колебаний, относящихся к δ -активности, что позволяет отследить состояние анестезии с использованием показателя SEF 95 (95% spectral edge frequency, частота края спектра). Необходимо отметить, что для оценки степени глубины наркоза такого показателя недостаточно [3], поэтому в настоящем исследовании для оценки глубины анестезии и седации были использованы специальные индексы ритма ЭЭГ ($K_{\delta/\theta}$ и $I_{\text{восст}}$). $K_{\delta/\theta}$ — показатель, описывающий отношение δ - и θ -ритма и характеризующий степень бодрствования животных после введения седативного препарата; $I_{\text{восст}}$ — показатель степени восстановления состояния бодрствования после введения антагониста дексмететомидина (антипамезол, пророксан).

Дексмететомидин широко используется в качестве средства для седации пациентов в интенсивной терапии или в послеоперационном периоде. Являясь высокоселективным агонистом α_2 -адренорецепторов, дексмететомидин оказывает выраженный седативный эффект, сочетающийся с анальгетическим и симпатолитическим действием при отсутствии влияния на дыхание [4, 5], стабилизирует гемодинамику при эндотрахеальной интубации и при хирургическом воздействии, снижая потребность в анестетиках и опиоидах [6]. Антиишемическое и антигипоксическое действия данного препарата в сочетании с ограниченным профилем его побочных эффектов позволяют широко применять его в качестве вспомогательного средства для общей и регионарной анестезии [7, 8].

Применение α_2 -адреноагонистов в качестве анестезирующих средств может быть связано с рядом побочных эффектов, например с временной гипертензией, выраженной гипотонией и брадикардией. Для устранения гипнотического, седативного и побочного действия дексмететомидина на дыхательную и сердечно-сосудистую системы в ветеринарной практике применяют синтетический α_2 -адреноблокатор атипамезол [6]. Комбинация атипамезола с ксилазином [9], медетомидином [10], дексмететомидином [11] или кетамин [12] способствует выходу из глубокого наркоза и сокращает время восстановления после него.

Отмечено, что седации, вызываемой дексмететомидином, может препятствовать введение $\alpha_{1,2}$ -адреноблокатора пророксана. Так, например, известно, что внутримышечная инъекция пророксана блокировала седативный эффект клофелина у кроликов и кошек [13].

Цель работы — оценка влияния α_2 -адреноблокаторов пророксана и атипамезола на изменение отношения индексов ритмов волн электроэнцефалограмм при введении дексмететомидина.

Материалы и методы

Исследование было проведено на кроликах-самцах линии Советская шиншилла массой $3,0 \pm 0,3$ кг ($n=12$), полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская обл.). Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), методическими указаниями по содержанию и использованию лабораторных животных¹, Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях, и в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14. Исследование было одобрено на заседании биоэтической комиссии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, протокол заседания № Rabbits-01-2019 от 20.11.2019. Все животные были взяты из одной партии и прошли период адаптации в течение 5 сут, затем разделены на 4 группы в зависимости от получаемых препаратов (табл. 1).

Для исследования использовали физиологический раствор (Натрия хлорид-СОЛОфарм 0,9%, ООО «Гротекс»), дексмететомидин (Дексдор, концентрат для приготовления раствора для инфузий 100 мкг / 1 мл, «Орион Корпорейшн»), α_2 -адреноблокатор атипамезол (Антиседан, раствор для инъекций 0,5%, «Орион Фарма»), пророксан (субстанция пророксана гидрохлорид, ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА России).

Запись электроэнцефалограмм животных осуществляли с помощью чашечковых электродов с использованием 8-канального энцефалографа «Нейрон-Спектр-1» (ООО «Нейрософт») с полосой пропускания 0,5–35 Гц и частотой дискретизации 500 Гц. Непосредственно перед регистрацией поверхность головы животных тщательно выбривали и обрабатывали 70% спиртовым раствором. Крепление электродов осуществляли с помощью контактной адгезивной электродной пасты «Унипаста» (ООО «Гельтек-Медиа»). Электроды FP1 и FP2 (лобные полюса) располагали над лобно-теменными областями коры головного мозга, электроды

¹ Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC: National Academy Press; 1996.

Таблица 1. Порядок введения веществ в группах экспериментальных животных

Table 1. Administration schedule for the experimental animal groups

Наименование группы <i>Group name</i>	Инъекция 1 (в начальный момент времени эксперимента) <i>Injection 1 (at the start of the experiment)</i>	Инъекция 2 (через 15 мин после начала эксперимента) <i>Injection 2 (15 min after the start of the experiment)</i>
Группа 1 <i>Group 1</i>	Физиологический раствор внутривенно <i>Intravenous normal saline</i>	Физиологический раствор внутривенно <i>Intravenous normal saline</i>
Группа 2 <i>Group 2</i>	Дексмететомидин, 100 мкг/кг подкожно <i>Dexmedetomidine, 100 µg/kg subcutaneously</i>	Физиологический раствор внутривенно <i>Intravenous normal saline</i>
Группа 3 <i>Group 3</i>	Дексмететомидин, 100 мкг/кг подкожно <i>Dexmedetomidine, 100 µg/kg subcutaneously</i>	Атипамезол, 50 мкг/кг внутримышечно (доза, эквимоларная дозе дексмететомидина) <i>Atipamezole, 50 µg/kg intramuscularly (equimolar to the dose of dexmedetomidine)</i>
Группа 4 <i>Group 4</i>	Дексмететомидин, 100 мкг/кг подкожно <i>Dexmedetomidine, 100 µg/kg subcutaneously</i>	Пророксан, 170 мкг/кг внутривенно (доза, эквимоларная дозе дексмететомидина) <i>Proroxan, 170 µg/kg intravenously (equimolar to the dose of dexmedetomidine)</i>

С3 и С4 (центральные отведения) — над теменно-затылочными. Референтный электрод устанавливали на область переносицы, заземляющий игольчатый электрод — под кожу на спине. На протяжении всего времени эксперимента (записи ЭЭГ) кролики находились в пластмассовых фиксаторах.

После подготовки животного и расположения электродов осуществляли фоновую запись ЭЭГ

в течение 10–15 мин. Далее вводили изучаемые вещества с интервалом в 15 мин и проводили последующую запись энцефалографической активности в течение 90 мин (табл. 1, рис. 1). При перекрестном дизайне исследования было сделано по 4 записи (4 особи, некоторые животные могли участвовать в 2 разных экспериментах с интервалом >2 недель). Из полученных энцефалограмм выбирали 60-секундные участки

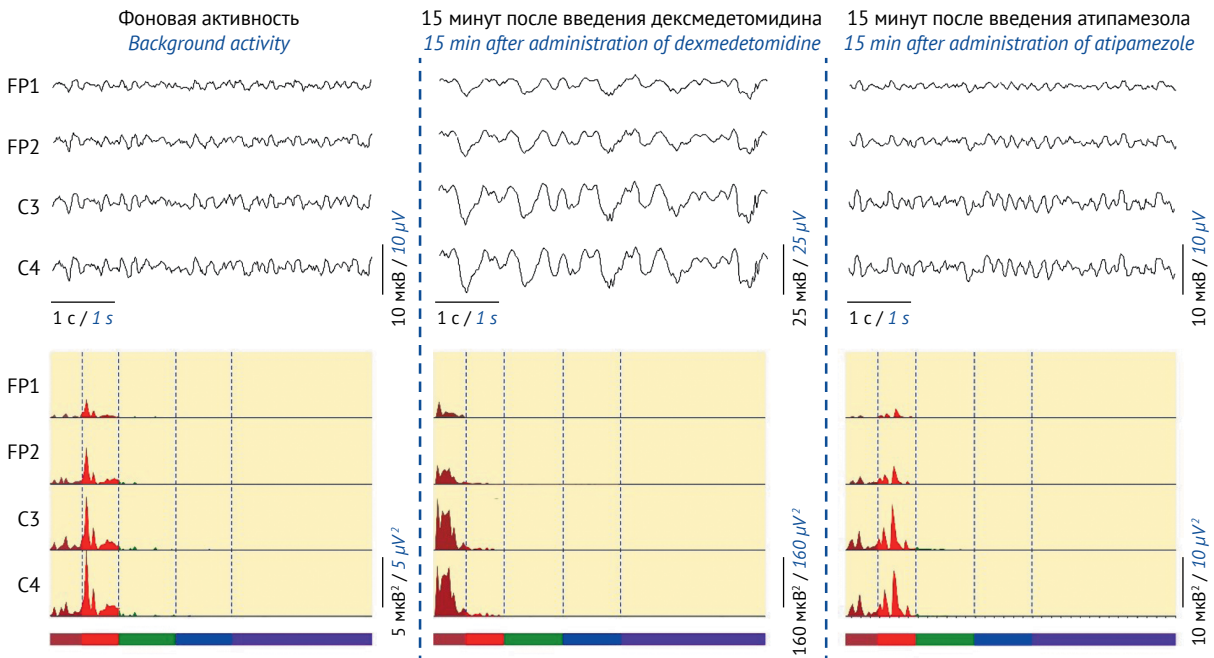


Рис. 1. Примеры 5-секундных фрагментов электроэнцефалограмм кролика (группа 3) и соответствующие им зависимости спектральной мощности. Бордовым, красным, зеленым, синим и фиолетовым цветами представлены δ -, θ -, α -, низкочастотные β - и высокочастотные β -ритмы соответственно. FP1, FP2 — лобные полюса; C3, C4 — центральные отведения.

Fig. 1. Exemplar 5-second fragments of electroencephalograms of rabbits (group 3) and the corresponding spectral power values. Bordeaux, red, green, blue, and purple colours represent δ -, θ -, α -, low- and high-frequency β -rhythms, respectively; FP1 and FP2, frontal poles; C3 and C4, central leads.

записи в различные периоды эксперимента: фоновая запись перед первой инъекцией, 5 и 15 мин после первой инъекции, 15, 45 и 75 мин – после второй.

На выбранных участках записи проводили анализ, включавший расчет индексов δ - (0,5–4,0 Гц), θ - (4,0–8,0 Гц), α - (8,0–14,0 Гц) и β -ритмов (низкочастотных 14,0–20,0 и высокочастотных 20,0–35,0 Гц). Индекс ритма вычисляли как долю интенсивности сигналов энцефалограммы, принадлежащих определенному частотному диапазону, от интенсивности сигналов всех частотных диапазонов, зарегистрированных за заданное время.

В наших пилотных исследованиях было отмечено, что седация, вызываемая у кроликов введением дексмедетомидина, характеризуется выраженным увеличением индекса δ -ритма и одновременным снижением индекса θ -ритма, поэтому в качестве показателя, характеризующего уровень бодрствования испытуемых животных, нами было выбрано отношение индексов δ - и θ -ритмов ($K_{\delta/\theta}$) (табл. 2, рис. 2). Для фоновой записи были характерны высокие значения индекса θ -ритма и низкие – δ -ритма.

Для оценки степени восстановления состояния бодрствования был использован индекс восстановления ($I_{\text{восст}}$) – отношение $K_{\delta/\theta}$, полученное через 15 мин после введения антагониста (атипамезол, пророксан), к значению фоновой записи перед первой инъекцией (рис. 3).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software). Осуществляли проверку нормальности распределения количественных признаков с использованием W -критерия Шапиро–Уилка. При нормальном распределении количественных признаков значимость различий независимых выборок оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с post-hoc-тестом по Даннетту; при распределении, отличном от нормального, – с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с post-hoc-тестом по Данну. Определяли медианное значение (Me) и перцентили [25–75%].

Результаты и обсуждение

У кроликов в состоянии бодрствования наблюдали преобладание θ -активности, отмечалась

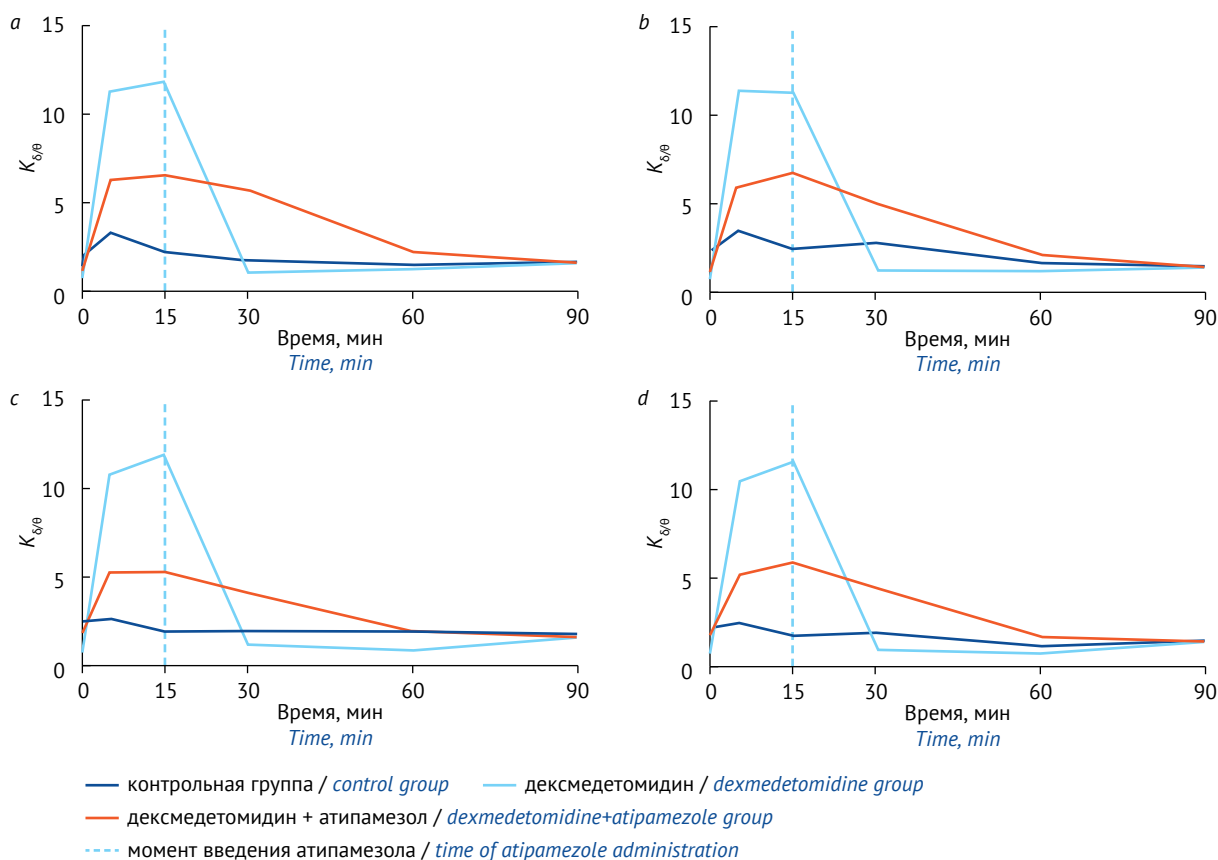


Рис. 2. Динамика значений показателя $K_{\delta/\theta}$ у кроликов в отведениях: а – FP1, б – FP2 (лобные полюса); в – C3, д – C4 (центральные отведения).

Fig. 2. Time course of $K_{\delta/\theta}$ values observed in rabbits in frontal (a, FP1; b, FP2) and central (c, C3; d, C4) leads.

Таблица 2. Отношение индексов δ - и θ -ритмов ($K_{\delta/\theta}$) до и после введения препаратов кроликам

Table 2. δ - to θ -rhythm index ratios ($K_{\delta/\theta}$) in rabbits before and after dosing

Время фиксации показаний Time of recording	Группа 1 Group 1				Группа 2 Group 2				Группа 3 Group 3				Группа 4 Group 4			
	FP1	FP2	C3	C4	FP1	FP2	C3	C4	FP1	FP2	C3	C4	FP1	FP2	C3	C4
Фоновое значение Background value	2,12	2,48	2,52	2,38	1,33	1,38	1,79	1,73	0,88	0,94	0,67	0,68	0,46	0,53	0,50	0,54
5 мин после введения 5 min after administration	3,36	3,45	2,60	2,59	6,38	5,93	5,26	5,31	11,36	11,37	10,81	10,63	11,20	9,92	11,21	10,42
15 мин после введения 15 min after administration	2,38	2,44	1,99	1,91	6,63	6,75	5,25	6,00	11,83	11,34	11,98	11,59	9,49	9,39	9,08	8,95
30 мин после введения 30 min after administration	1,84	2,90	1,94	2,00	5,77	5,11	4,15	4,55	1,19	1,33	1,14	1,18	10,00	8,65	10,14	9,86
60 мин после введения 60 min after administration	1,58	1,75	1,89	1,34	2,39	2,16	1,93	1,80	1,35	1,27	0,92	0,92	2,20	2,64	1,93	1,51
90 мин после введения 90 min after administration	1,79	1,45	1,81	1,35	1,75	1,56	1,61	1,61	1,64	1,52	1,47	1,52	1,05	1,30	1,12	1,21

Примечание. FP1, FP2 — лобные полюса; C3, C4 — центральные отведения.

Note. FP1 and FP2, frontal poles; C3 and C4, central leads.

пограничная активность между δ - и θ -ритмами. При подкожном введении дексмететомидина мощность δ -ритмов постепенно увеличивалась, мощность θ -ритмов снижалась. Данная тенденция достигала своего максимума через 10 мин и длилась дольше 2 ч, о чем свидетельствовало сохранение индекса $K_{\delta/\theta}$, достигнутого через 15 мин после введения дексмететомидина.

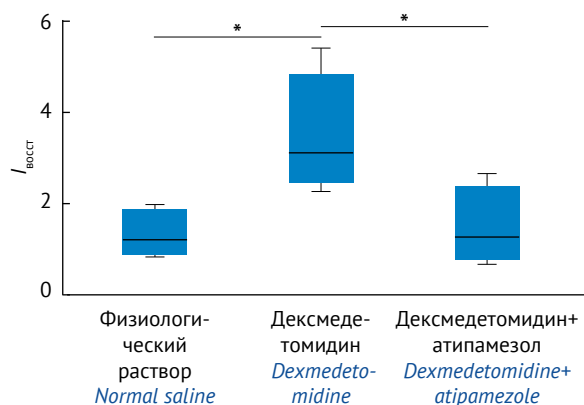


Рис. 3. Усредненные значения $I_{\text{восст}}$ всех регистрируемых отведений у животных экспериментальных групп.

Fig. 3. Averaged recovery values ($I_{\text{восст}}$) from all recorded leads in the experimental animal groups.

* — уровень статистической значимости различий $p < 0,05$ как для групп, получавших физиологический раствор и дексмететомидин, так и для групп, получавших дексмететомидин и дексмететомидин+атипамезол

* The level of significance, $p < 0,05$, is the same for the differences between the groups receiving normal saline or dexmedetomidine and between the groups receiving dexmedetomidine or dexmedetomidine+atipamezole

Можно сделать вывод, что при подкожном введении дексмететомидина в дозе 100 мг/кг седация у кроликов длится более 1,5 ч.

После внутримышечного введения атипамезола соотношение индексов ритмов постепенно возвращалось к исходным значениям. При этом на ~60 мин эксперимента отмечался кратковременный подъем мощности δ -ритмов (табл. 3). Введение пророксана после дексмететомидина не оказало влияния на соотношение индексов ритмов волн, визуально седация наблюдалась в течение 1,5 ч записи (табл. 4).

При введении атипамезола возникала стимуляция α_{2A} -адренорецепторов, расположенных в области голубого пятна ствола мозга, что вызывало снижение мощности δ -ритмов и увеличение мощности θ -ритмов. Такое воздействие нарушает адренергическую передачу по восходящим нервным волокнам в вентролатеральном преоптическом ядре таламуса, что, в свою очередь, приводит к активации исходящего из этого ядра ГАМК-ергического торможения туберомамиллярного ядра [14].

Введение пророксана не оказывало влияния на отношения индексов ритмов волн после введения дексмететомидина, мощности δ - и θ -ритмов оставались на значениях, достигнутых введением дексмететомидина. Возможными причинами отрицательного результата в отношении эффектов пророксана являются видоспецифические особенности его фармакологии, а также необходимость применения большей дозы для прерывания действия дексмететомидина.

Таблица 3. Мощность ритмов головного мозга кроликов (группа 3) в зависимости от введения препаратов

Table 3. Rabbit brain rhythm power as a function of medicinal product administration (group 3)

Индекс ритма, % <i>Rhythm index, %</i>						
Отведение <i>Lead</i>	Весь диапазон <i>Full range</i>	δ -ритм <i>δ-rhythm</i>	θ -ритм <i>θ-rhythm</i>	α -ритм <i>α-rhythm</i>	β -НЧ-ритм <i>β-LF-rhythm</i>	β -ВЧ-ритм <i>β-HF-rhythm</i>
Через 15 мин после введения дексмедетомидина <i>15 min after dexmedetomidine administration</i>						
FP1	100	93,7	4,3	1,2	0,4	0,4
FP2	100	93	4,5	1,3	0,5	0,6
C3	100	93,9	4,2	1,2	0,4	0,4
C4	100	93,3	4,4	1,2	0,5	0,5
Через 15 мин после введения атипамезола <i>15 min after atipamezole administration</i>						
FP1	100	4,7	84,3	8,5	1,3	1,2
FP2	100	5,1	80,7	10,2	1,8	2,1
C3	100	4,7	84,3	8,5	1,3	1,2
C4	100	4,6	83,2	9,1	1,5	1,5

Примечание. Отведения FP1, FP2 – лобные полюса; C3, C4 – центральные отведения; НЧ – низкочастотный ритм; ВЧ – высокочастотный ритм.

Note. FP1 and FP2, frontal poles; C3 and C4, central leads; LF, low frequency rhythm; HF, high frequency rhythm.

Таблица 4. Мощность ритмов головного мозга кроликов (группа 4) в зависимости от введения препаратов

Table 4. Rabbit brain rhythm power as a function of medicinal product administration (group 4)

Индекс ритма, % <i>Rhythm index, %</i>						
Отведение <i>Lead</i>	Весь диапазон <i>Full range</i>	δ -ритм <i>δ-rhythm</i>	θ -ритм <i>θ-rhythm</i>	α -ритм <i>α-rhythm</i>	β -НЧ-ритм <i>β-LF-rhythm</i>	β -ВЧ-ритм <i>β-HF-rhythm</i>
Через 15 мин после введения дексмедетомидина <i>15 min after dexmedetomidine administration</i>						
FP1	100	86,7	9,4	1,9	1,3	0,7
FP2	100	84,8	9,8	2,6	1,8	0,9
C3	100	86,3	10,3	1,7	1,2	0,5
C4	100	84,2	11,1	2,2	1,9	0,6
Через 15 мин после введения пророксана <i>15 min after proroxan administration</i>						
FP1	100	87,2	7,9	2,8	1,3	0,8
FP2	100	86	8	3,1	1,6	1,1
C3	100	88,1	7,7	2,5	1,1	0,6
C4	100	88,5	7,6	2,2	1,2	0,4

Примечание. Отведения FP1, FP2 – лобные полюса; C3, C4 – центральные отведения; НЧ – низкочастотный ритм; ВЧ – высокочастотный ритм.

Note. FP1 and FP2, frontal poles; C3 and C4, central leads; LF, low frequency rhythm; HF, high frequency rhythm.

Заключение

Введение кроликам дексмедетомидина приводит к увеличению мощности δ -ритмов

и снижению мощности θ -ритмов. Применение атипамезола способствует возвращению отношения индексов ритмов волн к изначальным.

Внутривенное введение пророксана при седации дексмететомидином не оказало влияния на восстановление паттерна ЭЭГ.

Атипабезол устраняет седативное и гипнотическое действие дексмететомидина, что подтвер-

ждает возможность его применения в ветеринарной практике для вывода из наркоза. В свою очередь, применение пророксана с целью устранения седативного эффекта дексмететомидина неэффективно.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Vachon P, Dupras J, Prout R, Blais D. EEG recordings in anesthetized rabbits: comparison of ketamine-midazolam and telazol with or without xylazine. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 1999;38(3):57–61.
2. Jameson LC, Sloan TB. Using EEG to monitor anesthesia drug effects during surgery. *J Clin Monit Comput*. 2006;20(6):445–72.
<https://doi.org/10.1007/s10877-006-9044-x>
3. Tong S, Thakor NV. *Quantitative EEG analysis methods and clinical applications*. Norwood: Artech House; 2009.
4. Weerink MAS, Struys MMRF, Hannivoort LN, Barends CRM, Absalom AR, Colin P. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of dexmedetomidine. *Clin Pharmacokinet*. 2017;56(8):893–913.
<https://doi.org/10.1007/s40262-017-0507-7>
5. Ramadhyani U, Park JL, Carollo DS, Waterman RS, Nossaman BD. Dexmedetomidine: clinical application as an adjunct for intravenous regional anesthesia. *Anesthesiol Clin*. 2010;28(4):709–22.
<https://doi.org/10.1016/j.anclin.2010.08.008>
6. Tonner PH. Alpha 2-adrenoceptor agonists in anaesthesia. In: *Euroanaesthesia: Refresher course lectures*. Glasgow; 2003. P. 43–9.
7. Lee S. Dexmedetomidine: present and future directions. *Korean J Anesthesiol*. 2019;72(4):323–30.
<https://doi.org/10.4097/kja.19259>
8. Afonso J, Reis F. Dexmedetomidine: current role in anesthesia and intensive care. *Rev Bras Anesthesiol*. 2012;62(1):118–33.
[https://doi.org/10.1016/S0034-7094\(12\)70110-1](https://doi.org/10.1016/S0034-7094(12)70110-1)
9. Kiriha Y, Takechi M, Kurosaki K, Matsuo H, Kajitani N, Saito Y. Effects of an anesthetic mixture of medetomidine, midazolam, and butorphanol and antagonism by atipamezole in rabbits. *Exp Anim*. 2019;68(4):443–52.
<https://doi.org/10.1538/expanim.18-0183>
10. Рощина ЛФ. Влияние клофелина на биоэлектрическую активность головного мозга. *Фармакология и токсикология*. 1980;(3):306–10.
Roshchina LF. Effect of clopheline on bioelectrical activity of the brain. *Pharmacology and Toxicology*. 1980;(3):306–10 (In Russ.).
11. Siegenthaler J, Pleyers T, Raillard M, Spadavecchia C, Levionnois OL. Effect of medetomidine, dexmedetomidine, and their reversal with atipamezole on the nociceptive withdrawal reflex in beagles. *Animals (Basel)*. 2020;10(7):1240.
<https://doi.org/10.3390/ani10071240>
12. Bruniges N, Yates D. Effects of atipamezole dosage and timing of administration on recovery time and quality in cats following injectable anaesthesia incorporating ketamine. *J Feline Med Surg*. 2020;22(6):589–97.
<https://doi.org/10.1177/1098612X19868547>
13. Jang HS, Choi HS, Lee SH, Jang KH, Lee MG. Evaluation of the anaesthetic effects of medetomidine and ketamine in rats and their reversal with atipamezole. *Vet Anaesth Analg*. 2009;36(4):319–27.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-2995.2009.00463.x>
14. Козлов ИА. Дексмететомидин при анестезиолого-реаниматологическом обеспечении кардиохирургических вмешательств. Часть 1. Общие сведения об агонистах α_2 -адренорецепторов и их фармакодинамике. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2014;7(3):63–73.
Kozlov IA. Dexmedetomidine in anesthetic and resuscitative care during cardiac surgery. Part 1. Overview of α_2 -adrenoceptors agonists and its pharmacodynamics. *Cardiology and Cardiovascular Surgery*. 2014;7(3):63–73 (In Russ.).

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Д.Ю. Ивкин, С.В. Оковитый — разработка дизайна эксперимента, редактирование текста рукописи; И.А. Никитина, Н.А. Анисимова, В.П. Ильницкий, Е.И. Елецкая, А.Ю. Гришина, У.В. Шаркова — регистрация ЭЭГ, введение препаратов, уход за животными; Ю.И. Сысоев — интерпретация ЭЭГ, статистическая обработка данных; А.Ю. Гришина, У.В. Шаркова — обобщение данных, написание текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Dmitry Yu. Ivkin and Sergey V. Okovityi designed the experiment and edited the manuscript. Inga A. Nikitina, Natalya A. Anisimova, Vasilii P. Ilnitskiy, Elizaveta I. Eletskaia, Anna Yu. Grishina, and Ulyana V. Sharkova recorded the EEGs, administered the medicinal products, and took care of the animals. Yuriy I. Sysoev interpreted the EEGs and carried out the statistical analysis of the data. Anna Yu. Grishina and Ulyana V. Sharkova summarised the data and drafted the manuscript.

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено на заседании биоэтической комиссии ФГБОУ ВО СПбФУ Минздрава России, протокол заседания № Rabbits-01-2019 от 20.11.2019.

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

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Ethics approval. The Bioethics Committee at the Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University approved the study under meeting minutes No(s) Rabbits-01-2019 of 20.11.2019.

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

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Гришина Анна Юрьевна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2448-513X>
grishina.anna@pharminnotech.com

Шаркова Ульяна Викторовна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1021-0338>
sharkova.ulana@pharminnotech.com

Сысоев Юрий Игоревич, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4199-5318>
sysoev.yurij@pharminnotech.com

Ивкин Дмитрий Юрьевич, канд. биол. наук, доцент.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>
dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Никитина Инга Алексеевна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5789-6475>
inga06819@gmail.com

Анисимова Наталья Аскольдовна, канд. биол. наук, доцент.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4019-4255>
natalia.anisimova@pharminnotech.com

Ильницкий Василий Петрович.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3054-3594>
vasilii.ilnitski@pharminnotech.com

Елецкая Елизавета Игоревна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9423-7249>
elizaveta.eleckaya@pharminnotech.com

Оковитый Сергей Владимирович, д-р мед. наук, профессор.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>
Sergey.Okovity@pharminnotech.com

Anna Yu. Grishina.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2448-513X>
grishina.anna@pharminnotech.com

Ulyana V. Sharkova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1021-0338>
sharkova.ulana@pharminnotech.com

Yuriy I. Sysoev, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4199-5318>
sysoev.yurij@pharminnotech.com

Dmitry Yu. Ivkin, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>
dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Inga A. Nikitina.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5789-6475>
inga06819@gmail.com

Natalya A. Anisimova, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4019-4255>
natalia.anisimova@pharminnotech.com

Vasiliy P. Ilnitskiy.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3054-3594>
vasilii.ilnitski@pharminnotech.com

Elizaveta I. Eletskaia.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9423-7249>
elizaveta.eleckaya@pharminnotech.com

Sergey V. Okovityi, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>
Sergey.Okovity@pharminnotech.com

Статья поступила 16.12.2022

После доработки 30.01.2023

Принята к печати 07.03.2023

Received 16 December 2022

Revised 30 January 2023

Accepted 7 March 2023



Н.М. Фаустова¹ 
С.С. Петлицкая¹ 
И.Н. Ампилогова¹ 
М.В. Карлина¹ 
М.Н. Макарова² 
В.Г. Макаров¹ 

Ингибиторы нейраминидазы: разработка и валидация методики определения ингибирующего действия *in vitro*

¹ Закрытое акционерное общество «Санкт-Петербургский институт фармации»,
Заводская ул., д. 3, к. 245, г.п. Кузьмолковский, Всеволожский р-н,
Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

² Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ»,
Заводская ул., д. 3, к. 245, г.п. Кузьмолковский, Всеволожский р-н,
Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

✉ Фаустова Наталья Михайловна; faustova.nm@doclinika.ru

РЕЗЮМЕ

Ингибиторы нейраминидазы — класс препаратов, применяемый для лечения инфекции, вызываемой вирусами гриппа. Для скрининга потенциальных ингибиторов нейраминидазы представляет интерес разработка *in vitro* методик без использования вирусов в реакции. **Цель работы:** разработать и валидировать методику определения ингибирующего действия веществ по отношению к ферменту нейраминидаза (КФ 3.2.1.18) с использованием флуоресцентного субстрата 2'-4(4-метилумбеллиферил)- α -D-N-ацетилнейраминовой кислоты (4MU-NANA) *in vitro* на примере хиноидных пигментов — потенциальных ингибиторов нейраминидазы. **Материалы и методы:** в основе метода лежит ферментативное расщепление субстрата 4MU-NANA ферментом нейраминидазой с образованием флуоресцентного маркера 4-метилумбеллиферона с детекцией при длинах волн возбуждения/испускания 360/450 нм. **Результаты:** методика валидирована по параметрам: специфичность, линейность, точность, прецизионность. Линейность методики составила 0,31–80 мкМ 4-метилумбеллиферона. Точность для четырех уровней концентраций, включая нижний предел количественного определения, находилась в пределах 87–114%, т.е. относительная погрешность при оценке точности не превышала 15%. Внутривневная прецизионность составила 1,5–10,4%, междневная прецизионность 2,3–9,6%. При оценке ингибирующего действия на примере занамивира гидрата (0,6–150 нМ) точность составила 89–120%, прецизионность 3,1–11,0%. Для контрольных образцов занамивира гидрата значение IC_{50} составило 27 ± 3 нМ, для осельтамивира $IC_{50} = 16 \pm 2$ нМ. Для тестирования субстанций допустимо использовать растворители: диметилсульфоксид 50%, полисорбата 80 раствор 5%, этанол 50% и метанол 50 и 100%. Для соединений, нерастворимых в перечисленных растворителях, предложено получение комплексов включения с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином. Для исследуемого вещества биснафтазарина, хиноидного пигмента природного происхождения, IC_{50} составила 273 ± 28 нМ. **Заключение:** методика характеризуется удовлетворительной точностью и воспроизводимостью и может быть использована для скрининга потенциальных ингибиторов нейраминидазы. Для тестирования нерастворимых веществ предложено их применение в виде комплексов включения с циклодекстринами.

Ключевые слова: нейраминидаза; осельтамивир; занамивира гидрат; ингибирующее действие; 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин; биснафтазарин

Для цитирования: Фаустова Н.М., Петлицкая С.С., Ампилогова И.Н., Карлина М.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Ингибиторы нейраминидазы: разработка и валидация методики определения ингибирующего действия *in vitro*. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(1):60–76. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-387>

N.M. Faustova¹ 
S.S. Petlitskaya¹ 
I.N. Ampilogova¹ 
M.V. Karlina¹ 
M.N. Makarova² 
V.G. Makarov¹ 

Neuraminidase Inhibitors: Development and Validation of a Procedure for *In Vitro* Determination of the Inhibitory Effect

¹ St.-Petersburg Institute of Pharmacy,
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement,
Vsevolzhsky district, Leningrad region 188663, Russian Federation

² Joint Stock Company "Scientific and Production Association
HOME OF PHARMACY",
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement,
Vsevolzhsky district, Leningrad region 188663, Russian Federation

✉ **Natalia M. Faustova;** faustova.nm@doclinika.ru

ABSTRACT

Neuraminidase inhibitors are a class of antivirals used to treat influenza infections. Screening assays for potential neuraminidase inhibitors would benefit from the development of *in vitro* procedures that do not require handling viruses. **The aim of the study** was to develop and validate a procedure for *in vitro* determination of inhibitory effects on neuraminidase (EC 3.2.1.18), using 2'-4(methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (4MU-NANA) as a fluorogenic substrate and quinonoid pigments, potential neuraminidase inhibitors, as a case study. **Materials and methods:** the method is based on neuraminidase cleavage of 4MU-NANA to release fluorescent 4-methylumbelliferone, which is detected at the excitation and emission wavelengths of 360 and 450 nm, respectively. **Results:** the procedure was validated for specificity, range, accuracy, and precision. It remained linear over the range of 0.31–80 μ M of 4-methylumbelliferone. The accuracy for four concentration levels (including the LLOQ) was 87–114%; i.e., the relative error of accuracy evaluation was less than 15%. The intra- and inter-day precision ranged from 1.5 to 10.4% and from 2.3 to 9.6%, respectively. Inhibitory effect evaluation using zanamivir hydrate (0.6–150 nM) demonstrated the accuracy of 89–120% and the precision of 3.1–11.0%. The IC_{50} values for positive controls (zanamivir hydrate and oseltamivir) were 27 ± 3 and 16 ± 2 nM, respectively. The following solvents may be used: 50% dimethyl sulfoxide, 5% Polysorbate 80, 50% ethanol, 50 and 100% methanol. If a compound is insoluble in the solvents, it is possible to form inclusion complexes with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. For bisnaphthazarin, the natural quinonoid pigment used in the study, the IC_{50} amounted to 273 ± 28 nM. **Conclusion:** the procedure demonstrated adequate accuracy and reproducibility and is recommended for screening for potential neuraminidase inhibitors. In order to use the procedure for insoluble substances, the authors suggest forming inclusion complexes with cyclodextrins.

Key words: neuraminidase; oseltamivir; zanamivir hydrate; inhibitory effect; 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin; bisnaphthazarin

For citation: Faustova N.M., Petlitskaya S.S., Ampilogova I.N., Karlina M.V., Makarova M.N., Makarov V.G. Neuraminidase inhibitors: development and validation of a procedure for *in vitro* determination of the inhibitory effect. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):60–76. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-387>

Введение

Грипп — острое респираторное заболевание, вызываемое различными типами (А, В, С) вирусов гриппа. По частоте и количеству случаев грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) занимают первое место среди инфекционных заболеваний. Ежегодно в мире регистрируют от 3 до 5 млн случаев заболевания гриппом [1]. В России грипп и ОРВИ составляют до 90% от всех случаев инфекционных заболеваний [2]. Ежегодные эпидемические вспышки наносят ущерб здоровью населения и требуют затрат на лечение и реабилитацию пациентов [1].

Действие препаратов, используемых при гриппе, направлено на элиминацию возбудителя заболевания, купирование воспаления, уменьшение болевых проявлений, детоксикацию организма и повышение его защитных сил, а также на профилактику осложнений [3]. Поскольку вирус развивает резистентность в отношении лекарственных средств, то поиск новых активных фармацевтических субстанций (АФС) остается актуальным.

Вирус гриппа представляет собой частицы круглой или продолговатой формы размером 80–120 нм, покрытые мембраной, в которую погружены поверхностные белки — гемагглютинин (необходим для связывания с клеточными рецепторами и проникновения вируса внутрь клетки хозяина) и нейраминидазу (для выхода вируса из клетки хозяина) [4].

Применяемые для лечения гриппа химиопрепараты имеют различные молекулярные мишени [3, 5, 6]. Среди препаратов этиотропного действия можно выделить следующие основные группы:

- 1) блокаторы ионного канала (ингибиторы декапсидации вируса). Механизм действия препаратов заключается в ингибировании белка М2, необходимого для создания ионного канала и регулирующего рН в процессе «раздевания» вируса в эндосомах. Представители группы: амантадин и ремантадин;
- 2) ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы, блокирующие репликацию вируса. Представители группы: рибавирин, арбидол, фавипиравир;

- 3) ингибиторы нейраминидазы. Представители группы: занамивир и осельтамивир.

Ингибиторы нейраминидазы широко применяются для терапии гриппозных инфекций. Фермент нейраминидаза (КФ 3.2.1.18) — это экзосиалидаза, расщепляющая α-кетозидную связь между терминальным остатком сиаловой (N-ацетилнейраминовой) кислоты и следующим моносахаридным остатком [5, 7]. В природе нейраминидаза обнаружена не только в составе оболочек некоторых вирусов, в том числе гриппа, но и в ряде патогенных микроорганизмов (*Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* и др.). Нейраминидаза *C. perfringens* часто используется в лабораторной практике, в том числе для скрининга ингибиторов нейраминидаз [8].

Для вируса гриппа А известно девять подтипов нейраминидазы, для вируса типов В и С — по одному [7]. На антигенных различиях поверхностных гликопротеинов гемагглютинина и нейраминидазы основана классификация вирусов гриппа А. В человеческой популяции циркулируют вирусы гриппа А с нейраминидазами типов N1, N2 и N9¹. Природным резервуаром вируса гриппа типа А являются птицы, среди которых и циркулирует значительное количество антигенов различных вариантов вируса, в том числе высокопатогенные штаммы, например субтипов H5N1, H5N8, H5N6². У птиц, обитающих на территории Российской Федерации, чаще всего выявляют вирусы гриппа с нейраминидазами следующих типов: N1, N2, N6 и N8 [9].

В качестве потенциальных ингибиторов нейраминидазы представляют интерес хиноидные пигменты, выделенные из панцирей морских ежей. Разнообразие механизмов действия и эффектов, оказываемых, например, эхинохромом А и спинохромом А, привлекло внимание к изучению активности в отношении нейраминидаз вируса гриппа, родственных хиноидным пигментам соединений³.

Для создания новых препаратов необходима воспроизводимая методика оценки их способности ингибировать активность нейраминидазы.

Цель работы — разработать и валидировать методику определения ингибирующего действия

¹ Кононова АА. Псевдовиральная система на основе вируса везикулярного стоматита для поиска противовирусных средств, действующих на вирусные поверхностные белки: дис. канд. биол. наук. Новосибирск; 2020.

² Прогнозирование распространения птичьего гриппа в России и Японии для предупреждения и контроля: роль Восточноазиатского-Австралийского пролетного пути в перемещении генов и реассортации вируса гриппа. <https://rscf.ru/project/17-44-07001/>

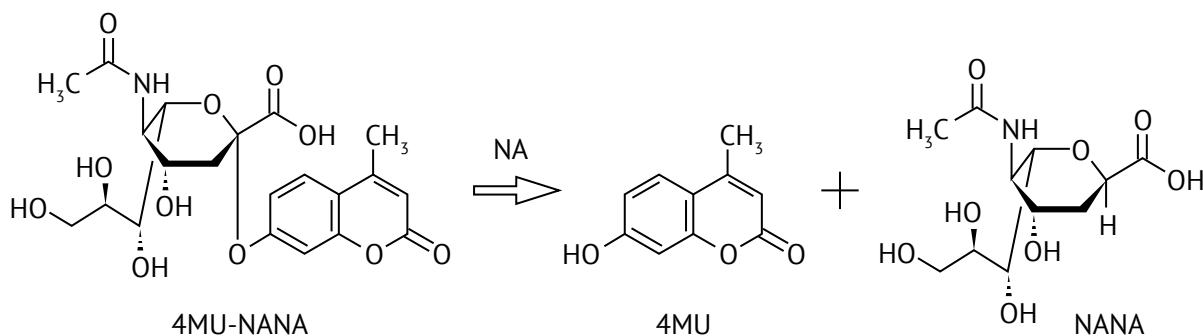
³ Васильева ЕА. Спинохромы морских ежей тихоокеанского региона: распространение и биологическая активность: дис. ... канд. хим. наук. Владивосток; 2019.

веществ по отношению к ферменту нейраминидаза (КФ 3.2.1.18) с использованием флуоресцентного субстрата 2'-4(4-метилумбеллиферил)- α -D-N-ацетилнейраминовой кислоты (4MU-NANA) *in vitro* на примере хиноидных пигментов – потенциальных ингибиторов нейраминидазы.

Существует несколько групп методов оценки активности нейраминидазы. Наиболее широко применяют методы с использованием синтетических субстратов с флуоресцентными или хемилюминесцентными метками. В отличие от методов с использованием культивируемых клеток, результаты таких анализов отличаются лучшей воспроизводимостью и позволяют прогнозировать трансляционность *in vivo* [10, 11]. Применение этих субстратов позволяет использовать данную методику достаточно широко, так как лицензию на работу с вирусами имеет ограниченное количество лабораторий.

Чувствительность хемилюминесцентного метода определения активности нейраминидазы (субстрат – 2-диоксетановое производное сиаловой кислоты (NA-STAR)) выше, чем флуоресцентного, однако хемилюминесцентный продукт гидролиза нестабилен – время жизни не превышает 5 мин [10].

В качестве субстратов могут быть использованы различные соединения [7, 8, 10–15].



Под действием нейраминидазы происходит расщепление субстрата с образованием N-ацетил- α -D-нейраминовой кислоты (NANA) и флуоресцентного маркера 4-метилумбеллиферона (4-MU), количество которого определяют при длине волны возбуждения 360 нм и длине волны излучения 465 нм.

В присутствии веществ, оказывающих ингибирующее действие на нейраминидазу, концентрация продуктов реакции снижается. Для сравнения эффективности ингибиторов определяют концентрацию максимального полунгибирования (IC_{50}).

Для разработки методов определения активности нейраминидазы, альтернативных колориметрическим и радиоактивным методам [5, 8], в качестве наиболее часто используемого субстрата применяется 2'-4(4-метилумбеллиферил)- α -D-N-ацетилнейраминовая кислота (MU-Neu5Ac или 4MU-NANA) [13, 14]. Ближайшим аналогом 4MU-NANA является 4-трифторметилумбеллиферил- α -N-ацетилнейраминовая кислота (CF₃MU-Neu5Ac). Высокая интенсивность флуоресценции этого вещества позволяет проводить анализ нейраминидаз низкой активности [12].

Для оценки активности нейраминидаз созданы коммерческие доступные наборы, содержащие готовые к использованию реагенты, однако при разработке собственной методики анализа стоимость исследования становится значительно ниже, так как большинство реагентов может быть приготовлено непосредственно в лаборатории в достаточных количествах. Субстраты, затраты на которые ранее составляли основную стоимость проведения анализа, теперь можно приобрести у различных производителей по конкурентоспособным ценам.

В основе выбранного нами метода лежит ферментативное расщепление субстрата 4MU-NANA ферментом нейраминидазой, представленное на схеме:

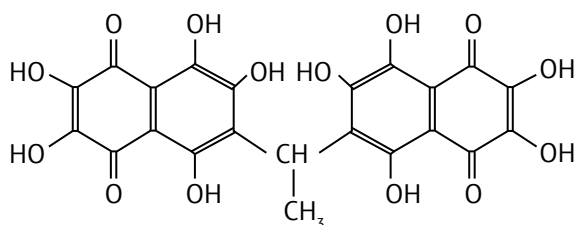
Материалы и методы

Для проведения исследования использовали следующее оборудование и материалы: анализатор микропланшетный CLARIOstar (BMG Labtech, Германия); система получения воды очищенной Simplicity® (Millipore, США); термостатированный шейкер ST-3L (ELMI, Латвия); весы лабораторные AR 2140 (Ohaus, Китай); планшеты 96-луночные черные полистироловые для флуоресценции OptiPlate (PerkinElmer, США).

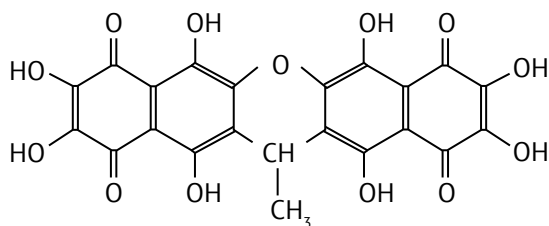
Реактивы. 4-метилумбеллиферон (4-MU) (99%, BLD Pharmatech Ltd, кат. № BD23062); субстрат

2'-4(4-метилумбеллиферил)- α -D-N-ацетилнейраминовой кислоты натриевая соль, гидрат (4MU-NANA) ($\geq 95\%$, Sigma-Aldrich, кат. № M8639); нейраминидаза *Clostridium perfringens* (C. *wilchii*) 6-го типа, лиофилизированная, 6–10 МЕ/мг белка (Sigma-Aldrich, кат. № 3001); 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин, (Sigma-Aldrich, кат. № 778907); 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES) (Sigma-Aldrich, кат. № M3671); кальций хлористый (безводный, ч.д.а., АО «ЛенРеактив»); натрий едкий, (98%, в чешуйках, ООО «НеваРеактив»); диметилсульфоксид (для культур клеток, ООО «БиолоТ», кат. № 1.4.7.); полисорбат 80 (твин 80) (PanReas AppliChem, кат. № 142050.1611); метанол (х.ч., АО «Вектон»).

Объекты исследования. Комплекс 1% биснафтазарина в виде соединения включения в матрицу 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина (БН- β -ЦД) (ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», Россия). Биснафтазарин – хиноидный пигмент природного происхождения, выделенный из панцирей зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis*. Биснафтазарин является смесью изомеров биснафтазаринов, основными из которых являются этилиденбиснафтазарин и ангидроэтилиден-6,6-bis(2,3,7-тригидроксинафтазарин).



этилиденбиснафтазарин (этилиден-6,6-bis-(2,3,7-тригидроксинафтазарин)



ангидроэтилиден-6,6-bis(2,3,7-тригидроксинафтазарин)

Молярная масса биснафтазаринов, входящих в состав анализируемой субстанции, в среднем составляет 490 г/моль [16].

Для повышения растворимости биснафтазарина был получен его комплекс с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином (β -ЦД) в виде

соединения включения одним из наиболее распространенных методов – методом соразстворения с последующим упариванием растворителя [17].

Положительными контролями являлись препарат Тамифлю® (75 мг осельтамивира в виде осельтамивира фосфата 98,5 мг; «Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд», Швейцария) и субстанция занамивира гидрат ($\geq 98\%$, CAS № 551942-41-7, Китай).

Приготовление калибровочных растворов стандартного образца (СО) 4-метилумбеллиферона (4-MU). Навеску 4-MU массой 0,0113 г растворяли в 10 мл спирта этилового 50%. Из полученного сток-раствора с концентрацией 6,4 мМ с помощью последовательного разбавления в рабочем буферном растворе готовили калибровочные растворы с концентрациями 3,1–3200 мкМ.

С учетом разбавления в реакционной смеси концентрация СО 4-MU составила 0,31–320 мкМ.

Приготовление испытуемых растворов положительного контроля № 1 осельтамивира. Содержимое 1 капсулы препарата Тамифлю® (75 мг в пересчете на осельтамивир) растворяли при перемешивании в 75 мл воды очищенной, фильтровали (фильтр обеззоленный «красная лента») для отделения от нерастворимых в воде вспомогательных компонентов. Полученный сток-раствор имел концентрацию 3,20 мМ (1 мг/мл). Далее путем серии последовательных разведений готовили растворы с концентрациями 0,026–0,64 мкМ. Концентрации положительного контроля № 1 в реакционной смеси с учетом разведения составили 0,001–0,032 мкМ.

Подготовка испытуемых растворов положительного контроля № 2 занамивира гидрата. Навеску занамивира гидрата массой 0,01000 г, взвешенную с точностью до 0,00001 г, растворяли в 10 мл воды, очищенной при периодическом перемешивании. Концентрация полученного сток-раствора составила 1,0 мг/мл (3,0 мМ). Далее путем серии разведений водой очищенной готовили испытуемые растворы положительного контроля № 1 с концентрациями 0,04–15 мкМ (в реакционной смеси 0,002–0,75 мкМ).

Приготовление испытуемых растворов субстанции. Навеску БН- β -ЦД массой 0,20000 г, взвешенную с точностью до 0,00001 г, растворяли в 1 мл метанола. Концентрация комплекса в сток-растворе составила 167 мг/мл, в пересчете на биснафтазарин 1,67 мг/мл (3,40 мМ). Далее путем серии последовательных

разведений в метаноле и в воде очищенной готовили растворы с концентрациями биснафтазина $C_1 = 34$ мкМ; $C_2 = 3,40$ мкМ; $C_3 = 0,34$ мкМ. С учетом разбавления в реакционной смеси концентрация пигментов составила 1,7, 0,17, 0,02 мкМ соответственно.

Приготовление испытуемого раствора 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина с концентрацией 2 мг/мл. Навеску 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина массой 0,010 г (точная навеска) растворяли в 5 мл растворителя. В качестве растворителей использовали как воду очищенную, так и метанол.

Анализ проводили согласно описанию в статьях [6, 13] с оптимизацией условий процедуры. Измерение интенсивности флуоресценции проводили на анализаторе микропланшетном CLARIOstar.

Для проведения ферментативной реакции использовали рабочий буферный раствор 140 мкМ MES-NaOH (pH 6,5), содержащий 4 мМ CaCl_2 , 1 мМ раствор субстрата 4MU-NANA в рабочем буферном растворе и раствор нейраминидазы 6 типа с концентрацией 0,7 МЕ/мл.

В лунки планшета для отрицательного контроля вносили по 10 мкл растворителя(-ей), используемых для приготовления испытуемых растворов; в лунки для положительного контроля вносили по 10 мкл растворов положительных контролей № 1 и 2. В следующие лунки вносили по 10 мкл испытуемых растворов субстанции БН-β-ЦД и гидроксипропил-β-циклодекстрина. Каждый анализ выполняли не менее чем в трех повторностях. Во все лунки вносили по 160 мкл рабочего буферного раствора и по 10 мкл рабочего раствора нейраминидазы (0,7 МЕ/мл). Планшет заклеивали пленкой и инкубировали 10 мин при температуре 25 °С и перемешивании 650 об./мин в термостатирующем шейкере. После инкубации во все лунки вносили по 20 мкл рабочего раствора субстрата 4MU-NANA (1,0 мМ). Незамедлительно помещали планшет в прибор, перемешивали 30 с при 650 об./мин и измеряли интенсивность флуоресценции при длинах волн возбуждения/испускания $360 \pm 20 / 450 \pm 30$ нм в кинетическом режиме каждые 60 с в течение 10 мин при температуре 37 °С, усиление сигнала (gain) – 600.

Конечные концентрации реагентов в реакционной смеси составили 0,035 МЕ/мл фермента, 0,1 мкмоль/мл субстрата, 0,133 мкмоль/мл MES, 3,8 мкмоль/мл CaCl_2 .

В качестве бланк-раствора, не содержащего аналита и фермента, использовали раствор, состоящий из 170 мкл рабочего буферного раствора, 10 мкл растворителя, использованного для приготовления растворов тестируемых соединений, и 20 мкл рабочего раствора субстрата 4MU-NANA (1,0 мМ).

Обработку результатов выполняли с использованием программного обеспечения Mars 3.31 (BMG Labtech, Германия) и программы Statistica 10 (Statsoft, США).

Скорость ферментативной реакции (v , RFU/мин) – изменение интенсивности флуоресценции от времени – при длинах волн возбуждения/испускания $360 \pm 20 / 450 \pm 30$ нм рассчитывали для всех анализируемых образцов по формуле:

$$v = \frac{I_t - I_0}{\Delta t}, \quad (1)$$

где v – скорость реакции, RFU/мин; I_t – интенсивность флуоресценции после инкубации, RFU; I_0 – интенсивность флуоресценции, измеренная до начала инкубации (0 мин), RFU; Δt – длительность инкубации между начальным и конечным измерениями интенсивности флуоресценции, мин.

Ингибирующее действие (ИД, %) анализируемых веществ рассчитывали по формуле:

$$\text{ИД} = \frac{V_{\text{отр.к.}} - V_t}{V_{\text{отр.к.}}} \times 100, \quad (2)$$

где $V_{\text{отр.к.}}$ – скорость ферментативной реакции для отрицательного контроля (100% активности фермента), RFU/мин; V_t – скорость ферментативной реакции, определенная для испытуемых образцов БН-β-ЦД или образцов положительного контроля, RFU/мин.

По результатам анализа серии испытуемых растворов с различными концентрациями, для которых значение ИД находилось в диапазоне от 20 до 80%, строили зависимость изменения ИД от концентрации вещества, аппроксимировали подходящей функцией, коэффициент корреляции для которой составлял не менее 0,99. Затем с помощью уравнения полученной зависимости рассчитывали IC_{50} – концентрацию испытуемых/контрольных образцов, вызывающую 50% ингибирование активности нейраминидазы.

Активность фермента нейраминидазы (A_{NA}) рассчитывали в МЕ/л (мкмоль/мин/л) по формуле:

$$A_{\text{NA}} = \frac{v \times V_{\text{ал}}}{a_{4\text{-MU}} \times V_{\text{р.п.}}}, \quad (3)$$

где v — значение скорости ферментативной реакции (RFU/мин); a_{4-MU} — значение коэффициента «а», полученного при построении калибровочной зависимости для растворов СО 4-MU (RFU×л/мкмоль); $V_{p.p.}$ — общий объем реакционной смеси в лунках планшета, мл ($V_{p.p.} = 0,20$ мл); $V_{ал}$ — объем аликвоты раствора нейраминидазы, мл ($V_{ал} = 0,01$ мл).

Калибровочные, испытуемые и контрольные пробы при определении активности нейраминидазы были проанализированы как единая серия в рамках одного аналитического цикла.

Результаты и обсуждение

При проведении анализов *in vitro* для поиска соединений — потенциальных ингибиторов нейраминидазы применение вирусов гриппа возможно только в специализированных лабораториях, имеющих лицензию на работу с вирусами. Применение для этих же целей рекомбинантного изолированного фермента возможно в условиях практически любой аналитической лаборатории, имеющей соответствующее оборудование. В статьях с описанием метода [6, 8, 13] отсутствует строгая регламентация ряда параметров, например времени и условий инкубации субстрата с тестируемыми образцами, выбора допустимых растворителей. Таким образом, условия испытания для методики с определенным набором реактивов должны быть определены экспериментально.

Несмотря на то что определение ингибирования нейраминидазы считается воспроизводимым методом, существует ряд критических точек (этапов):

- 1) приготовление испытуемых растворов контрольных и тестируемых образцов: погрешности в процессе приготовления растворов ингибитора нейраминидазы могут сместить кривые ингибирования и изменить значения IC_{50} ;
- 2) приготовление буферного раствора: изменение pH буферного раствора для анализа приводит к смещению значений IC_{50} , что может усложнить сравнение данных;
- 3) точность при дозировании всех растворов в процессе реакции, соблюдение времени и условий инкубации имеют решающее значение для получения воспроизводимых результатов анализов;
- 4) использование контрольных образцов позволяет отслеживать приемлемость полученных результатов анализа в течение длительного времени.

При разработке методики определения ингибирующего действия веществ в отношении

фермента исследователю, как правило, необходимо решить ряд задач:

- 1) оценить аналитический диапазон определения продукта ферментативной реакции 4-MU, оценить валидационные характеристики методики определения 4-MU в реакционной смеси;
- 2) выбрать подходящие для проведения тестирования растворители;
- 3) отработать методику с использованием известных специфических ингибиторов фермента (положительных контролей), оценить валидационные характеристики методики определения ингибирующего действия;
- 4) оценить влияние тестируемых соединений на активность фермента.

Для разработки методики и проверки пригодности условий постановки ферментативной реакции были использованы два известных ингибитора нейраминидазы, используемые в клинической практике (положительные контроли): занамивира гидрат и осельтамивира фосфат.

Выбор диапазона концентраций для приготовления испытуемых растворов положительных контролей занамивира гидрата и осельтамивира фосфата для пилотных экспериментов был основан на анализе данных литературы [6, 8, 13].

Для определения влияния занамивира гидрата на активность нейраминидазы предложена стадия предварительной инкубации фермента и тестируемой субстанции при комнатной температуре или 37 °C в течение 30–60 мин [6, 13]. Результаты пилотных экспериментов не соответствовали данным литературы, полученным при использовании тест-систем с вирусами [13]. При проведении длительной предварительной инкубации занамивира гидрата и осельтамивира (в течение 30 мин) их ингибирующее действие на активность фермента нейраминидазы не превышало 20–25%, а при увеличении длительности инкубации до 60 мин отсутствовало (результат измерения ИД был меньше погрешности методики, а скорость ферментативной реакции с ингибитором не отличалась от скорости реакции отрицательного контроля). Поэтому в дальнейшем проводили ряд экспериментов с различными условиями инкубации (табл. 1).

При тестировании растворов положительных контролей занамивира гидрата и осельтамивира без предварительной инкубации ИД составило 12–48% в зависимости от концентрации противовирусного препарата.

На основании дальнейших экспериментов было установлено, что предварительная инкубация

Таблица 1. Варианты условий проведения ферментативной реакции с нейраминидазой

Table 1. Variants of conditions for the enzymatic reaction with neuraminidase

№ варианта условий <i>Reaction conditions No.</i>	Условия предварительной инкубации фермента и положительного контроля <i>Conditions for pre-incubation of the enzyme and a positive control</i>			Условия ферментативной реакции (с субстратом) <i>Conditions for the enzymatic reaction (with the substrate)</i>		Ингибирующее действие, % <i>Inhibitory action, %</i>
	Время, мин <i>Time, min</i>	Температура, °C <i>Temperature, °C</i>	Перемешивание, об./мин <i>Shaking, rpm</i>	Время, мин <i>Time, min</i>	Температура, °C <i>Temperature, °C</i>	
1*	60**	37	Без перемешивания <i>No shaking</i>	10	37	Не ингибирует <i>No</i>
2	30		650			Менее 25 <i>Less than 25</i>
3	10					
4	10**	37		10	25	Не ингибирует <i>No</i>
5	Без предварительной инкубации <i>No pre-incubation</i>		650	10	37	11–55
6	5**	25	650	10	37	18–42
7	10					22–82

* Условия № 1 соответствовали литературным данным [12].

** Эксперименты проведены только с растворами положительного контроля занамивира гидрата.

* Conditions No. 1 corresponded to the literature data [12].

** These experiments were carried out using only positive control solutions of zanamivir hydrate.

фермента с растворами положительных контролей в реакционной смеси при комнатной температуре (23–25 °C) в течение 10 мин является оптимальной. Увеличение длительности инкубации до 15 мин не приводило к статистически значимому изменению величины ИД, поэтому все последующие эксперименты проводили в условиях № 7 (табл. 1), описанных в методической части.

Экспериментально полученное для осельтамира значение IC_{50} составило 16 ± 2 нМ, для занамивира гидрата — 27 ± 3 нМ, что сопоставимо с данными литературы [6, 8, 13].

Для получения достоверных данных при анализе методика должна быть валидирована. Валидация аналитической или биоаналитической методики — это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемой задачи. В качестве параметров валидации согласно рекомендациям были

выбраны: специфичность, линейность, точность и прецизионность внутри одной аналитической серии и между сериями⁴.

Специфичность (реже селективность) — способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут содержаться в образце (примеси, вспомогательные вещества, продукты деградации, матрица (среда)). Подобное определение специфичности содержится в большинстве руководств по валидации аналитических/биоаналитических методик. В «Руководстве по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств»⁵ содержатся дополнительные указания: «Процедуры подтверждения специфичности зависят от целевого назначения аналитической методики».

При разработке и валидации методики определения ингибирующего действия специфичность методики подтверждается специфичностью

⁴ Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine; 2018.

Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2011.

ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018. Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 113.

⁵ Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 113.

используемых в работе фермента и субстрата. Для работы были выбраны фермент и специфичный для него субстрат на основании характеристик производителя.

При оценке ингибирующего действия субстанций в отношении того или иного фермента сравнивают соотношение скоростей ферментативной реакции испытуемых проб с тестируемым соединением с пробами отрицательного контроля (растворителя).

В случае тестирования различных субстанций (не в составе лекарственной формы) специфичность сводится к проверке специфичности детектируемого продукта ферментативной реакции, наличию/отсутствию ингибирующего влияния матрицы (растворители, вспомогательное вещество для растворения тестируемых соединений 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин), а также наличию ингибирования (снижения скорости ферментативной реакции) в пробах положительного контроля, содержащих известные ингибиторы ферментов.

Для проверки специфичности детектирования окрашенного продукта ферментной реакции были получены спектры флуоресценции (возбуждения и испускания) бланк-раствора, калибровочного раствора 4-MU, модельных проб с добавками 4-MU в диапазоне длин волн от 320 ± 10 до 400 ± 10 / 450 ± 16 нм (рис. 1).

Для детектируемой области на спектрах 4-MU характерно наличие максимумов в области возбуждения при $\lambda = 320\text{--}330$ нм, а также в области испускания при $\lambda = 450 \pm 16$ нм. Аналогичные

спектры имеют модельные смеси с 4-MU, а также продукты ферментативной реакции. Бланк-раствор не имеет максимумов поглощения и не искажает спектры растворов детектируемого вещества 4-MU, являющегося продуктом ферментативной реакции, и не мешает его определению. Таким образом, флуориметрическое определение целевого продукта ферментативной реакции 4-MU является специфичным.

Для оценки специфичности проведения ферментативной реакции были построены кинетические кривые для растворов отрицательного контроля № 1 (метанола) и отрицательного контроля № 2 (воды очищенной), а также испытуемых растворов ингибиторов — осельтамивира и занамивира гидрата (рис. 2).

На протяжении всего периода проведения кинетической реакции характерно линейное изменение интенсивности флуоресценции от времени реакции. В присутствии специфических ингибиторов — осельтамивира и занамивира гидрата скорость увеличения интенсивности флуоресценции и, соответственно, скорость ферментативной реакции снижается. Анализ полученных данных свидетельствует об адекватности постановки ферментативной реакции, подтверждает специфичность методики по определению ингибирующего действия веществ на активность нейраминидазы.

В ходе валидации методики оценки биологической активности веществ проводили валидацию методики определения детектируемого продукта в реакционной смеси и валидацию определения ингибирующего действия.

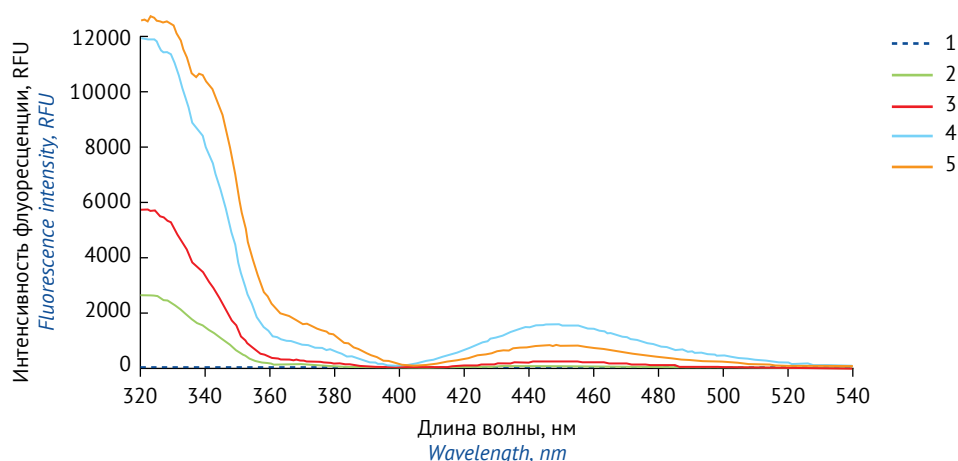


Рис. 1. Примеры спектров флуоресценции бланк-раствора (1), калибровочных растворов стандартных образцов 4-MU с концентрациями 0,1 мМ (2) и 1,42 мМ (5), модельной смеси с 4-MU на уровне среднего контроля качества (3) и продуктов ферментативной реакции (4)

Fig. 1. Examples of fluorescence spectra of the blank solution (1), calibration solutions of 4-methylumbelliferone standard (0.1 mM (2) and 1.42 mM (5)), model mixture containing 4-MU (at the middle quality control level) (3), and enzymatic reaction products (4)

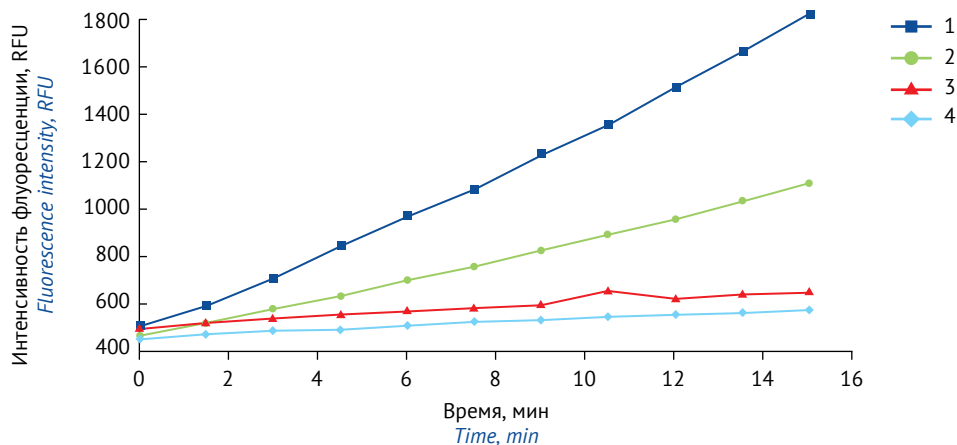


Рис. 2. Типичные изменения интенсивности флуоресценции в зависимости от времени реакции для растворов отрицательных контролей метанола (1), воды очищенной (2) и растворов положительных контролей занамивира гидрата (3), осельтамивира (4)

Fig. 2. Typical changes of fluorescence intensity as a function of reaction time for negative control solutions of methanol (1) and purified water (2) and for positive control solutions of zanamivir (3) and oseltamivir (4)

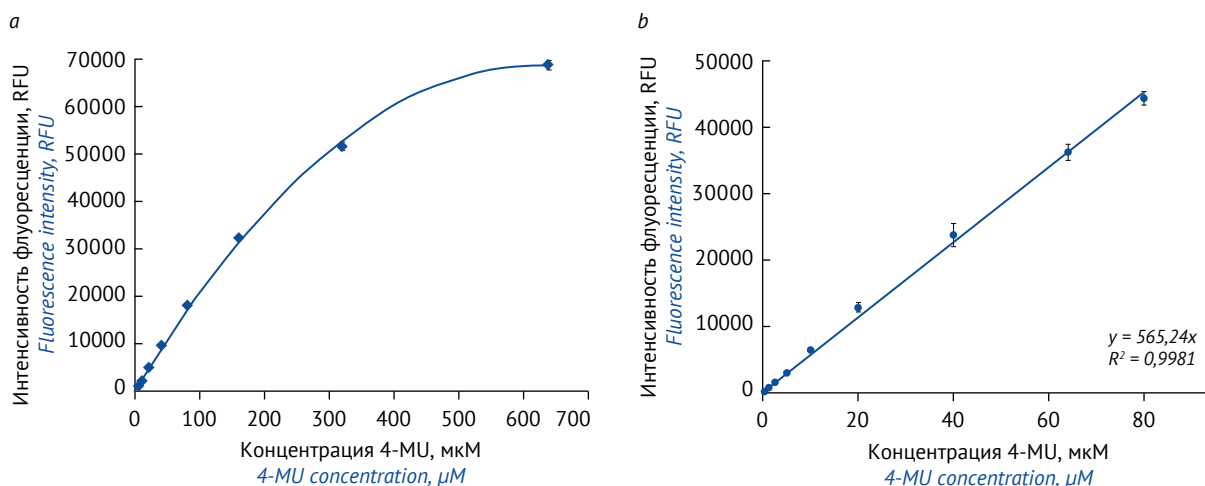


Рис. 3. Пример изменения интенсивности флуоресценции в зависимости от концентрации 4-MU в диапазоне 0,16–640 мкМ (а) с линейным участком в аналитическом диапазоне методики 0,31–80 мкМ (b)

Fig. 3. An example of fluorescence intensity changes as a function of 4-MU concentrations ranging from 0.16 to 640 μM (a); and the linear portion of the curve, representing the analytical range (0.31–80 μM) (b)

При оценке линейности (аналитической области) требуется показать, что аналитические сигналы пропорциональны концентрации анализируемого вещества в образце в пределах диапазона применения методики. На основании полученных данных методом наименьших квадратов проводят расчет уравнения регрессии и дополнительных статистических показателей.

Для выбора области линейности были проанализированы растворы 4-MU в широком диапазоне концентраций 0,16–640 мкМ (рис. 3а). Линейная зависимость интенсивности от концентрации 4-MU характерна для концентраций 0,31–80 мкМ (рис. 3б). Далее изменение сигнала становится нелинейным и выходит на плато. Интенсивность флуоресценции в соответствии с данными литературы измеряли при длинах волн возбуждения/

испускания 360/465 нм при значениях усиления сигнала 300, 500 и 600. Для дальнейшего проведения эксперимента значение усиления сигнала было выбрано равным 600.

Таким образом, линейная (аналитическая) область методики детектирования 4-MU составила 0,31–80 мкМ. Полученное по результатам трех аналитических циклов калибровочное уравнение (рис. 3б) $y = 565,24x$ (где y — интенсивность флуоресценции, RFU; x — содержание СО 4-MU в реакционной смеси, мкМ; коэффициент корреляции $r = 0,9990$) было в дальнейшем использовано для расчета валидационных параметров. Концентрация 4-MU 0,31 мкМ, соответствующая нижней точке на калибровочной зависимости, была принята в качестве нижнего предела количественного определения (НПКО).

Таблица 2. Валидационные параметры методики определения 4-MU в реакционной смеси

Table 2. Validation parameters of the procedure for determination of 4-MU in a reaction mixture

Валидационный параметр <i>Validation parameters</i>	Результаты <i>Results</i>
Линейная (аналитическая) область методики, мкМ <i>Linearity (analytical range), μM</i>	0,31–80,00
Калибровочное уравнение* <i>Calibration equation</i>	$y = 565,24x$
Коэффициент корреляции (r) <i>Correlation coefficient (r)</i>	0,9990
НПКО <i>LLOQ</i>	0,31
Точность, % (в одном цикле // между циклами) <i>Accuracy, % (intra-cycle // inter-cycle)</i>	
• 80 мкМ (ВПКО) • 80 mM (ULOQ)	95,3–102,1 // 97,9
• 40 мкМ (средний КК) • 40 mM (MQC)	91,7–113,7 // 104,6
• 0,63 мкМ (низкий КК) • 0.63 mM (LQC)	86,6–106,4 // 90,8
• 0,31 мкМ (НПКО) • 0.31 mM (LLOQ)	93,6–107,8 // 98,4
Прецизионность, % (внутридневная // междневная) <i>Precision, % (intra-day // inter-day)</i>	
• 80 мкМ (ВПКО) • 80 mM (ULOQ)	1,5–3,2 // 2,3
• 40 мкМ (средний КК) • 40 mM (MQC)	4,2–10,4 // 7,4
• 0,63 мкМ (низкий КК) • 0.63 mM (LQC)	1,5–8,9 // 9,6
• 0,31 мкМ (НПКО) • 0.31 mM (LLOQ)	1,5–5,6 // 5,4
Стабильность раствора стандартного образца <i>Stability of the Standard Solution</i>	
• при комнатной температуре • at room temperature	До 4 сут up to 4 days
• при температуре 2–8 °С • at a temperature of 2–8 °C	до 24 ч up to 24 h
• при температуре ниже –20 °С • at a temperature below –20 °C	не менее 7 сут minimum 7 days

Примечание. НПКО – нижний предел количественного определения; ВПКО – верхний предел количественного определения.

*у – относительная интенсивность флуоресценции, RFU; x – концентрация 4-MU в реакционной смеси, мкМ.

Note. LLOQ – lower limit of quantitation; MQC – middle quality control level; LQC – low quality control level; ULOQ – upper limit of quantitation.

*y – relative fluorescence intensity, RFU; x – 4-MU concentration in the reaction mixture, mM.

На основании полученной зависимости (рис. 3b) проводили обратный расчет концентраций калибровочных растворов. Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по графику, от фактических значений находились в пределах 0,2–13,8%, для НПКО 13,7–16,2%. Полученные отклонения соответствуют требованиям – не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек. Этому критерию должны соответствовать не менее чем 75% калибровочных стандартов не менее шести концентраций⁶. По итогам проведенных

испытаний этому критерию соответствовали 78–100% калибровочных стандартов.

В ходе валидации был определен предел обнаружения по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика. Данный способ хорошо применим к инструментальным методам анализа. Предел обнаружения 4-MU составил 0,11 мкМ.

Оценка точности и прецизионности выполнена по результатам анализа модельных растворов с 4-MU в необходимом количестве повторностей на четырех уровнях концентраций: нижний

⁶ Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 113.

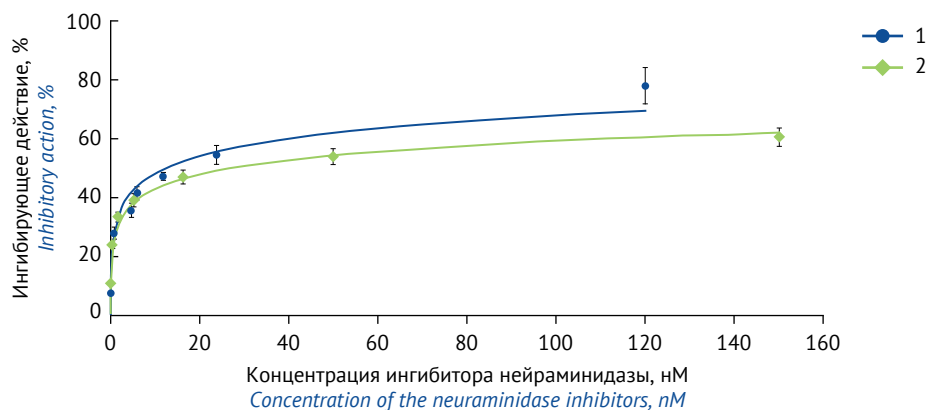


Рис. 4. Влияние на активность нейраминидазы осельтамивира (1) в диапазоне концентраций 0,038–120 нМ и занамивира гидрата (2) в диапазоне концентраций 0,2–150 нМ

Fig. 4. Effects of oseltamivir at concentrations of 0.038–120 nM (1) and zanamivir hydrate at concentrations of 0.2–150 nM (2) on neuraminidase activity

и верхний пределы количественного определения (ВПКО), контроли качества (КК) нижнего и среднего уровней концентраций (табл. 2).

Точность в общем случае должна составлять 85–115%, для нижнего предела количественного определения – 80–120%. Полученные результаты (86,6–113,7%, для НПКО 93,6–107,8%) соответствовали этим требованиям. Прецизионность также должна быть не более 15%, полученные значения на четырех уровнях концентраций (1,5–10,4%, для НПКО 1,5–5,6%) соответствовали требованиям, предъявляемым для биоаналитических методов анализа⁷.

Методика пригодна для оценки активности фермента нейраминидазы в диапазоне 0,015–4,0 МЕ/л.

Таким образом, по всем критериям получены результаты, свидетельствующие о специфичности, линейности, прецизионности и достаточно высокой чувствительности предлагаемой методики.

Для подтверждения корректности использованной методики были проанализированы растворы положительных контролей известных ингибиторов нейраминидазы осельтамивира и занамивира гидрата. Для расчета показателя IC_{50} были построены зависимости вида $y = b \times \ln x + a$ для диапазона концентраций, соответствующих дозозависимому изменению ИД от концентрации ингибиторов (рис. 4). Для осельтамивира значение IC_{50} составило 16 ± 2 нМ, для занамивира гидрата – $26,5 \pm 3,3$ нМ.

По данным литературы при тестировании *in vitro* IC_{50} занамивира в отношении вирусов гриппа

в зависимости от его типа в среднем составляет от 0,2 до 10,7 нМ, IC_{50} осельтамивира – от 0,34 до 15,2 нМ⁸ [12–14]. Полученные данные не противоречат данным литературы. Отличия представленных в различных источниках литературы значений IC_{50} могут быть обусловлены не только различием метода анализа, но и особенностями восприимчивости вирусов и ферментов различных типов, использованных в тестах, к воздействию ингибиторов. В работах [8, 15] указано, что бактериальные нейраминидазы отличаются большей устойчивостью к действию занамивира гидрата и осельтамивира и, соответственно, большими значениями IC_{50} .

На примере субстанции занамивира гидрата были оценены валидационные характеристики методики оценки ингибирующего действия в используемой тест-системе (рис. 5, табл. 3).

После усреднения результатов, полученных в трех аналитических циклах, была построена общая зависимость ИД (y) от концентрации субстанции (x): $y = 6,56802 \times \ln x + 28,32$ ($r = 0,9986$), которая далее была использована для валидационных расчетов.

За номинальную была принята концентрация 25 нМ, наиболее близкая к значению IC_{50} . Оценка валидационных параметров проведена для диапазона концентраций 0,6–150 нМ (диапазон концентраций, для которого характерно дозозависимое изменение ингибирующего действия), соответствующих ингибирующему действию занамивира гидрата 22,5–62,5%. По отношению к номинальному значению ИД = 50% аналитический диапазон составил 45–125%.

⁷ Там же.

⁸ Тамифлю®. Инструкция по применению. Видаль (Vidal). https://www.vidal.ru/drugs/tamiflu_37267

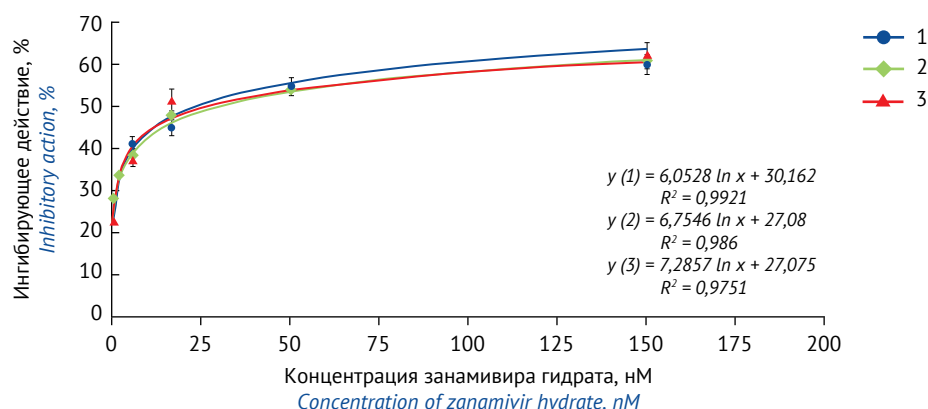


Рис. 5. Зависимости ингибирующего действия от концентрации занамивира гидрата, полученные в трех аналитических циклах

Fig. 5. The inhibitory action as a function of zanamivir hydrate concentrations observed in 3 runs

Таблица 3. Валидационные параметры методики определения ингибирующего действия занамивира гидрата

Table 3. Validation parameters of the procedure for determination of the inhibitory action of zanamivir hydrate

Валидационный параметр Validation parameters	Результаты Results		
Аналитическая область, нМ Analytical range, nM	0,6–150 (соответствует ИД 22,6–62,5%) 0.6–150 (corresponds to inhibitory action of 22.5–62.5%)		
Калибровочное уравнение* Calibration equation	$y = 6,56802 \times \ln x + 28,32$		
Коэффициент корреляции (r) Correlation coefficient (r)	0,9986		
Прецизионность, % (внутридневная // междневная) Precision, % (intra-day // inter-day)			
150 нМ / nM	3,1–7,0 // 5,5		
25 нМ / nM**	2,9–8,1 // 6,0		
5,5 нМ / nM	4,6–8,9 // 6,7		
0,6 нМ / nM	4,3–11,0 // 9,0		
Точность, % (в одном цикле // между циклами) Accuracy, % (intra-cycle (n = 3) // inter-cycle (n = 9))	Теоретическое значение ИД, % Expected inhibitory action, %	Полученные значения ИД, % Observed inhibitory action, %	Точность, % Accuracy, %
150 нМ / nM	62,5	56,3–67,0 // 61,4 ± 3,4	90–107 // 98
25 нМ / nM**	49,4	45,3–54,0 // 50,2 ± 3,0	92–109 // 102
5,5 нМ / nM	38,6	35,2–41,2 // 38,7 ± 2,6	91–107 // 100
0,6 нМ / nM	22,6	20,2–27,2 // 23,6 ± 2,1	89–120 // 105

* у – ИД (ингибирующее действие), %; x – концентрация занамивира гидрата, нМ.

** концентрация занамивира гидрата (25 нМ), принятая за номинальную, для которой ИД наиболее близко к значению 50%.

* у – inhibitory action, %; x – zanamivir hydrate concentration, nM.

** This concentration of zanamivir hydrate (25 nM) was taken as the nominal value; its inhibitory action was the closest to 50%.

Точность в общем случае должна составлять 85–115%, для НПКО – 80–120%. Полученные результаты (90–109%, для НПКО 89–120%) соответствовали этим требованиям. Прецизионность также должна быть не более 15%, полученные значения (3,1–8,9%, для НПКО 4,3–11,0%) соответствовали требованиям, предъявляемым для биоаналитических методов анализа⁹.

При использовании тест-систем *in vitro* / *ex vivo*, содержащих ферменты, для соединений, практически нерастворимых в воде, исследователи часто сталкиваются с проблемой выбора растворителей, совместимых с данной тест-системой.

Решение данной проблемы возможно двумя путями:

⁹ Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine; 2018.
Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009. London: Committee for Medicinal Products for Human Use; 2011.

Таблица 4. Влияние растворителей на активность нейраминидазы ($\bar{X} \pm SD$, $n = 3$)

Table 4. Solvent effects on neuraminidase activity ($\bar{X} \pm SD$, $n = 3$)

Растворитель* <i>Solvent*</i>	Активность нейраминидазы, мМЕ/л <i>Neuraminidase activity, mIU/L</i>
Вода очищенная / рабочий буферный раствор <i>Purified water / assay buffer solution</i>	141 ± 9
2-гидроксипропил-β-циклодекстрин в воде (2 мг/мл) <i>(2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin in water</i>	157 ± 12
Диметилсульфоксид 100% <i>100% Dimethyl sulfoxide</i>	111 ± 1**
Диметилсульфоксид 50% <i>50% Dimethyl sulfoxide</i>	193 ± 31
Этанол 50% <i>50% Ethanol</i>	301 ± 36**
Метанол 100% <i>100% Methanol</i>	463 ± 24**
Метанол 50% <i>50% Methanol</i>	435 ± 5***
2-гидроксипропил-β-циклодекстрин в метаноле (2 мг/мл) <i>(2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin in methanol (2 mg/mL)</i>	413 ± 16***
Полисорбат 80 5% <i>5% Polysorbate 80</i>	193 ± 23

* Концентрация растворителя указана без учета разбавления в реакционной смеси.

** Полученные значения скорости ферментативной реакции имеют статистические отличия от значений, полученных для воды очищенной.

*** Полученные значения скорости ферментативной реакции имеют статистические отличия от значений, полученных для воды очищенной ($p < 0,05$), но не имеют отличий от значений, полученных для метанола ($p \geq 0,05$). Оценка влияния растворителя на активность фермента была проведена при помощи однофакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным сравнением критерия Тьюки при $p < 0,05$.

* The concentrations of solvents in the table do not account for dilution in the reaction mixture.

** The values of enzymatic reaction rate are significantly different from the values obtained with purified water.

*** The values of enzymatic reaction rate are significantly different from the values obtained with purified water ($p < 0.05$), but do not differ from the values obtained with methanol ($p \geq 0.05$). The effect of solvents on enzyme activity was evaluated using one-way analysis of variance followed by Tukey's test at $p < 0.05$.

- 1) предварительная оценка влияния растворителя на активность фермента;
- 2) получение водорастворимых комплексов нерастворимого соединения при использовании различных полимеров.

В качестве возможных растворителей были выбраны диметилсульфоксид (ДМСО) 50 и 100%, спирт этиловый 50%, метанол 50 и 100%, полисорбата 80 раствор 5% (табл. 4). Также было оценено возможное влияние 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина, на основе которого был получен комплекс включения биснафтазарина, на активность нейраминидазы.

Среднее значение скорости ферментативной реакции для воды очищенной было принято в качестве номинальной скорости реакции.

На основании полученных данных необходимо отметить следующее:

- ДМСО 50% и полисорбата 80 раствор 5% не оказывают статистически значимого влияния

на скорость ферментативной реакции по сравнению с водой очищенной. Данные растворители могут быть рекомендованы для приготовления растворов тестируемых субстанций;

- β-ЦД не оказывает влияния на активность нейраминидазы;
- ДМСО 100% ингибирует действие нейраминидазы в среднем на 27%, что больше допустимого уровня 15%, поэтому в дальнейшем для приготовления растворов тестируемых субстанций его применение было признано нецелесообразным;
- спирт этиловый 50%, метанол 50 и 100% повышают активность нейраминидазы, что может быть обусловлено лучшей растворимостью флуоресцентной метки 4-MU в буферных растворах в присутствии этих растворителей. Их применение может быть целесообразным, если тестируемые соединения невозможно растворить иными способами. Ингибирующее действие тестируемых образцов оценивается

Таблица 5. Влияние тестируемых образцов на активность фермента нейраминидазы, ингибирующее действие, % ($\bar{X} \pm SD$, $n = 3$)

Table 5. The impact of tested samples on neuraminidase activity, expressed as inhibitory action, % ($\bar{X} \pm SD$, $n = 3$)

Название испытуемого образца <i>Name of the tested sample</i>	Концентрация в реакционной смеси <i>Concentration in the reaction mixture</i>		Ингибирующее действие, % <i>Inhibitory action, %</i>
	мкг/мл <i>μg/mL</i>	нМ <i>nM</i>	
Комплекс 1% биснафтазарина с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином* <i>1% complex of bisnaphthazarin with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin*</i>	0,008	17,0	30 ± 5
	0,084	170	42 ± 2
	0,84	1700	67 ± 2
Занамивира гидрат** <i>Zanamivir hydrate**</i>	0,56	550	75 ± 9
Осельтамивир** <i>Oseltamivir**</i>	0,002	6,0	42 ± 3
	0,010	32,0	76 ± 5

* Концентрация комплекса приведена в пересчете на субстанцию, т.е. в реакционной смеси концентрация комплекса в целом в 100 раз больше и составила 0,8; 8,4 и 84 мкг/мл.

** Положительные контроли, ингибиторы нейраминидазы.

* Concentrations of the complex are expressed as active substance concentrations; i.e., the overall concentration of the complex in the reaction mixture was 100 times higher and amounted to 0.8; 8.4, and 84 mg/mL, respectively.

** Positive controls, neuraminidase inhibitors.

по отношению к соответствующему отрицательному контролю, т.е. выбранный растворитель используется в качестве отрицательного контроля.

Для тестирования водорастворимых соединений, в том числе положительных контролей (занамивира гидрата, осельтамивира) в качестве растворителя выбрана вода очищенная.

В таблице 5 представлены результаты определения влияния контрольных веществ (занамивира и осельтамивира) и БН-β-ЦД на активность фермента нейраминидазы.

Тестирование субстанции природного биснафтазарина без комплекса включения затруднительно, так как субстанция нацело не растворяется ни в одном из предложенных растворителей. Поэтому было принято решение о тестировании этой субстанции в составе комплекса с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином. Особенности технологии получения такого комплекса описаны в литературе [17].

1% комплекс БН-β-ЦД оказывает выраженное ингибирующее действие на активность фермента нейраминидазы, IC_{50} которого составило 273 ± 28 нМ ($n = 3$). Пигменты биснафтазарина могут быть рекомендованы для дальнейшего изучения как перспективные субстанции для создания препаратов для лечения инфекционных заболеваний.

Эффективность ингибитора значительно зависит от биологического происхождения

фермента. В нашем исследовании использовали бактериальную нейраминидазу. В ряде работ [8, 15, 18] для *in vitro* тестирования были использованы нейраминидазы как бактериального, так и вирусного происхождения. В целом было показано ингибирующее действие ряда соединений, в том числе занамивира и осельтамивира, против как вирусной, так и бактериальной нейраминидазы, но в больших концентрациях. Для соединений, ингибирующих бактериальную нейраминидазу, можно прогнозировать наличие ингибирующего действия в отношении вирусной нейраминидазы.

Использованная в работе валидированная методика является доступной для большинства аналитических лабораторий и пригодной для скрининга и выбора для дальнейшего тестирования соединений — ингибиторов нейраминидаз, потенциальных кандидатов в лекарственные средства.

Закключение

Разработана и валидирована быстрая, воспроизводимая и достаточно простая методика определения ингибирующего действия веществ по отношению к ферменту нейраминидазе с использованием флуоресцентного субстрата 2'-4(4-метилумбеллиферил)-α-D-N-ацетилнейраминовой кислоты (4MU-NANA). Методика валидирована по показателям специфичности, линейности, точности и прецизионности, удовлетворяет современным валидационным требованиям и может быть использована в дальнейшем

для оценки ингибирующего действия различных веществ на изучаемый фермент — потенциальных кандидатов в лекарственные средства.

Для контрольного образца занамивира гидрата значение IC_{50} составило 27 ± 3 нМ, для контрольного образца осельтамивира $IC_{50} = 16 \pm 2$ нМ. Полученные данные не противоречат данным литературы, что подтверждает корректность постановки методики.

Для тестирования субстанции рекомендуется использовать следующие растворители: ДМСО 50%, полисорбата 80 раствор 5%, спирт этиловый 50% и метанол 50 и 100%. При применении таких растворителей, как этанол и метанол, *in vitro* отмечено повышение активности нейраминидазы по сравнению с другими

растворителями, однако при расчете ингибирующего действия их влияние как отрицательных контролей учитывается и не искажает получаемых данных. Для тестирования труднорастворимых соединений возможно рекомендовать получение комплексов включения с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином. Раствор 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина не оказывает статистически значимого влияния на активность нейраминидазы.

Комплекс 1% биснафтазарина природного происхождения с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином является ингибитором нейраминидазы, IC_{50} которого составило 273 ± 28 нМ, и может быть рекомендован для дальнейшего изучения как фармацевтическая субстанция, активная в отношении инфекционных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Лусс ЛВ. Современные принципы диагностики и терапии гриппа. *Русский медицинский журнал*. 2007;(5):407. [Luss LV. Modern principles of diagnosis and therapy of influenza. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*. 2007;(5):407 (In Russ.)]
2. Митрофанова ВН, Мельников ВЛ, Юрина НВ, Бурко ПА. Сравнительный анализ клинико-эпидемиологических особенностей течения гриппа А (H1N1/2009) в период эпидемиологического подъема заболеваемости. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2010;15(3):74–5. [Mitrofanova VN, Mel'nikov VL, Yurina NV, Burko PA. Comparative analysis of clinical and epidemiological features of influenza A (H1N1/2009) during the epidemic rise in cases. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskie nauki*. 2010;15(3):74–5 (In Russ.)]
3. Якимов СС. Рациональный подход к комплексной терапии гриппа. *Медицинский совет*. 2013;1–2:26–31. [Yakimov SS. Rational approach to complex treatment of influenza. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*. 2013;1–2:26–31 (In Russ.)]
4. Филдс Б, Найп Д, ред. *Вирусология*. Т. 2. М.: Мир; 1989. [Fields B, Knipe D, eds. *Virology*. V. 2. Moscow: Mir; 1989 (In Russ.)]
5. Ohuchi M, Feldmann A, Ohuchi R, Klenk HD. Neuraminidase is essential for fowl plague virus hemagglutinin to show hemagglutinating activity. *Virology*. 1995;212(1):77–83. <https://doi.org/10.1006/viro.1995>
6. Jagadeesh A, Salam AA, Madgal PP, Arunkumar G. Influenza virus neuraminidase (NA): a target for antivirals and vaccines. *Arch Virol*. 2016;161(8):2087–94. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2907-7>
7. Штыря ЮА, Мочалова ЛВ, Бовин НВ. Нейраминидаза вируса гриппа: структура и функция. *Acta Naturae*. 2009;1(2):28–34. [Shtyrya YA, Mochalova LV, Bovin NV. Influenza virus neuraminidase: structure and function. *Acta Naturae*. 2009;1(2):28–34] <https://doi.org/10.32607/20758251-2009-1-2-26-32>
8. Jeong HJ, Ryu YB, Park SJ, Kim JH, Kwon HJ, Kim JH, et al. Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from *Rhodiola rosea* roots and their *in vitro* anti-influenza viral activities. *Bioorg Med Chem*. 2009;17(19):6816–23. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.08.036>
9. Sharshov KA, Yurlov AK, Li X, Wang W, Li L, Bi Yu, et al. Avian influenza virus ecology in wild birds of Western Siberia. *Avian Res*. 2017;8(12):1–5. <https://doi.org/10.1186/s40657-017-0070-9>
10. Buxton RC, Edwards B, Juo RR, Voyta JC, Tisdale M, Bethell RC. Development of a sensitive chemiluminescent neuraminidase assay for the determination of influenza virus susceptibility to zanamivir. *Anal Biochem*. 2000;280(2):291–300. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4517>
11. Potier M, Mameli L, Belisle M, Dallaire L, Melancon SB. Fluorometric assay with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminate) substrate. *Anal Biochem*. 1979;94(2):287–96. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90362-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90362-2)
12. Engstler M, Talhouk JW, Smith RE, Shauner R. Chemical synthesis of 4-trifluoromethylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic acid glycoside and its use for the fluorometric detection of poorly expressed natural and recombinant sialidases. *Anal Biochem*. 1997;250(2):176–80. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2205>
13. Leang SK, Hurt AC. Fluorescence-based neuraminidase inhibition assay to assess the susceptibility of influenza viruses to the neuraminidase inhibitor class of antivirals. *J Vis Exp*. 2017;(122):55570. <https://doi.org/10.3791/55570>
14. Wetherall NT, Trivedi T, Zeller J, Hodges-Savola C, McKimm-Breschkin JL, Zambon M, Hayden FG. Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical isolates to neuraminidase inhibitors: report of the neuraminidase inhibitor susceptibility network. *J Clin Microbiol*. 2003;41(2):742–50. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.742-750.2003>
15. Nishikawa T, Shimizu K, Tanaka T, Kuroda K, Takayama T, Yamamoto T, et al. Bacterial neuraminidase rescues influenza virus replication from inhibition by a neuraminidase inhibitor. *PLoS One*. 2012;7(9):e45371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045371>

16. Pozharitskaya ON, Shikov AN, Makarova MN, Ivanova SA, Kosman VM, Makarov VG, et al. Antiallergic effects of pigments isolated from green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) shells. *Planta Med.* 2013;79(18):1698–704. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1351098>
17. Никитин НА. Циклодекстрины и их комплексы включения. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2015;(6):3–11. [Nikitin NA. Cyclodextrins and their inclusion complexes. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii* = *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry.* 2015;(6):3–11 (In Russ.)]
18. Quosdorf S, Schuetz A, Kolodziej H. Different inhibitory potencies of oseltamivir carboxylate, zanamivir, and several tannins on bacterial and viral neuraminidases as assessed in a cell-free fluorescence-based enzyme inhibition assay. *Molecules.* 2017;22(11):1989. <https://doi.org/10.3390/molecules22111989>

Вклад авторов. Н.М. Фаустова — планирование исследования, разработка и валидации методики, обработка и систематизация экспериментальных данных, подготовка и доработка рукописи; С.С. Петлицкая — анализ образцов, валидация методики; И.Н. Ампилогова — получение образцов биснаф-тазарина, критическая переработка текста, проверка и коррекция перевода на английский язык; М.В. Карлина — обсуждение и интерпретация результатов, доработка рукописи; М.Н. Макарова — критический пересмотр текста и представленных данных, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; В.Г. Макаров — концепция исследования.

Благодарности. Работа выполнена как инициативное исследование без финансовой поддержки. Авторы выражают признательность и благодарность ст. научн. сотруднику Ю.В. Дадали (ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации») за получение и предоставление для тестирования 1% комплекса биснаф-тазарина с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином.

Конфликт интересов. М.Н. Макарова является членом редакционной коллегии журнала «Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. Natalia M. Faustova — research planning, development and validation of the method, processing and organisation of experimental data, drafting and editing of the article; Seraphima S. Petlitskaya — samples testing and method validation; Irina N. Ampilogova — obtaining of bisnaphthazarin samples, revision of the text, checking and correction of the translation; Marina V. Karlina — discussion and interpretation of the results, revision of the paper; Marina N. Makarova — revision of the text and illustrative material, approval of the final version of the article for publication; Valery G. Makarov — design of the study concept.

Acknowledgements. The research was author-initiated and received no financial support. The authors are grateful to Yu.V. Dadali (St.-Petersburg Institute of Pharmacy) for obtaining and providing 1% complex of bisnaphthazarin with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin for testing.

Conflict of interest. Marina N. Makarova is a member of the Editorial Board of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*, the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Фаустова Наталья Михайловна, канд. хим. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>
faustova.nm@doclinika.ru

Петлицкая Серафима Сергеевна.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4735-3079>
petlitskaya.ss@doclinika.ru

Ампилогова Ирина Николаевна, канд. хим. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0833-3371>
ampilogova.in@doclinika.ru

Карлина Марина Валерьевна, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>
karlina.mv@doclinika.ru

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
makarova.mn@doclinika.ru

Макаров Валерий Геннадьевич, д-р мед. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>
makarov.vg@doclinika.ru

Natalia M. Faustova, Cand. Sci. (Chem.).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>
faustova.nm@doclinika.ru

Seraphima S. Petlitskaya.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4735-3079>
petlitskaya.ss@doclinika.ru

Irina N. Ampilogova, Cand. Sci. (Chem.).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0833-3371>
ampilogova.in@doclinika.ru

Marina V. Karlina, Cand. Sci. (Biol.).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>
karlina.mv@doclinika.ru

Marina N. Makarova, Dr. Sci (Med.).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
makarova.mn@doclinika.ru

Valery G. Makarov, Dr. Sci (Med.).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>
makarov.vg@doclinika.ru

Статья поступила 29.09.2021

После доработки 10.01.2022

Принята к печати 07.06.2022

Online first 16.06.2022

Article was received 29 September 2021

Revised 10 January 2022

Accepted for publication 7 June 2022

Online first 16 June 2022



А.Н. Афанасьева 
В.Б. Сапарова 
И.Е. Макаренко 
Р.В. Драй 
Т.А. Сельменских 

Опыт проведения валидации *in vitro* методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы

Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг»,
ул. Связи, д. 34а, Санкт-Петербург, пос. Стрельна, 198515,
Российская Федерация

✉ Афанасьева Алина Николаевна; Alina.Afanaseva@geropharm.com

РЕЗЮМЕ

Согласно требованиям нормативных документов, как российских, так и международных, методики, применяющиеся при исследовании биоэквивалентности, сопоставимости показателей качества биотехнологических (биологических) препаратов, выпускающем контроле качества лекарственных препаратов и прочих не менее важных *in vitro* исследованиях, должны быть валидированы. Для этих исследований *in vitro* используют тесты на связывание молекулы с рецептором и на биологическую активность препаратов. Однако в настоящее время не существует единого подхода к валидации биоаналитических методик *in vitro*, не связанных с определением концентрации действующего вещества в биологических жидкостях. **Цель работы:** валидировать методику оценки инсулинозависимого захвата глюкозы и доказать пригодность набора ГЛЮКОЗА GOD-PAP для определения глюкозы в культуральной среде. **Материалы и методы:** в исследовании использовали препараты производства ОАО «ГЕРОФАРМ» РинФаст® и плацебо к инсулину аспарт, клеточную линию миобластов крысы L6J1, набор ГЛЮКОЗА GOD-PAP для определения концентрации глюкозы. Исследование проводили на дифференцированных клетках, которые культивировали в течение 7 сут. Для дифференцировки L6J1 использовали питательную среду DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л и 2% сыворотки лошадиной. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения Prism 9. **Результаты:** продемонстрированы показатели специфичности методики; в максимальной концентрации препарат отличается от плацебо в 4 раза по остаточному уровню глюкозы в культуральной среде. Определена прецизионность методики: сходимость составила 4–9%, внутрилабораторная прецизионность 11–16%. Коэффициент вариации устойчивости методики составил 14% в 4 независимых экспериментах в 9 аналитических сериях. Проведено сравнение инсулиновых продуктов (инсулин аспарт и генно-инженерный инсулин человека), для которых показатели концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) различались в 1,5 раза. Для набора ГЛЮКОЗА GOD-PAP коэффициент детерминации линейной регрессии составил 0,9983; чувствительность — 1 ммоль/л, диапазон правильности — 95–107%. **Выводы:** можно утверждать, что методика является специфичной, высокопрецизионной и устойчивой для проведения оценки инсулинозависимого захвата глюкозы с использованием клеточной линии миобластов крысы L6J1 в качестве тест-системы и является пригодной для детектирования биологической активности препаратов инсулина в *in vitro* исследованиях.

Ключевые слова: валидация биоаналитических методик *in vitro*; клеточная линия миобластов крысы L6J1; метаболическая активность; биологическая активность; инсулин; определение глюкозы в клеточной культуральной среде; инсулинозависимый захват глюкозы

Для цитирования: Афанасьева А.Н., Сапарова В.Б., Макаренко И.Е., Драй Р.В., Сельменских Т.А. Опыт проведения валидации *in vitro* методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(1):77–88. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-398>

A.N. Afanasyeva 
V.B. Saparova 
I.E. Makarenko 
R.V. Drai 
T.A. Selenskikh 

Experimental Validation of an *In Vitro* Method for Assessing Insulin-Dependent Glucose Uptake

Pharm-Holding, CJSC
34-A Svyazi St., St. Petersburg, Strelina 198515, Russian Federation

✉ Alina N. Afanasyeva; Alina.Afanaseva@geropharm.com

ABSTRACT

Russian and international regulatory documents require that analytical procedures for establishing bioequivalence and comparability of quality attributes of biotechnological (biological) products, carrying out batch release of medicinal products, and conducting other equally important *in vitro* studies must be validated. These *in vitro* studies include molecule–receptor binding and product bioactivity assays. However, at present, there is no single approach to validation of *in vitro* bioanalytical methods not involving the determination of active ingredient concentrations in biological fluids. **The aim of the work** was to validate a procedure for assessing insulin-dependent glucose uptake and demonstrate the suitability of GOD-PAP GLUCOSE kits for glucose determination in culture media. **Materials and methods:** The study used RinFast® insulin aspart by Geropharm, Russia; a placebo for insulin aspart; the L6J1 rat myogenic cell line; and a GOD-PAP GLUCOSE kit for quantitative determination of glucose. The study was carried out on differentiated cells cultured for 7 days. To encourage L6J1 differentiation, the authors used DMEM with 4.5 g/L glucose and 2% horse serum. The statistical analysis of results was performed using Prism 9. **Results:** The study demonstrated the analytical procedure's specificity, as the concentration of residual glucose in the culture medium observed with the placebo was 4 times higher than that with the maximum concentration of the medicinal product. The determination of precision showed the repeatability of 4–9% and the intralaboratory precision of 11–16%. The coefficient of variation for robustness amounted to 14% in 4 independent experiments comprising a total of 9 analytical runs. The authors compared insulin products (the insulin aspart and a genetically engineered human insulin), and the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values differed by 1.5 times. For the GOD-PAP GLUCOSE kit, the linear regression coefficient of determination was 0.9983, the sensitivity amounted to 1 mmol/L, and the accuracy ranged between 95% and 107%. **Conclusions:** the procedure using L6J1 rat myoblasts as a test system may be considered specific, highly precise, and robust in assessing insulin-dependent glucose uptake and suitable for detecting biological activity of insulin preparations *in vitro*.

Key words: validation of *in vitro* bioanalytical methods; L6J1 rat myogenic cell line; metabolic activity; biological activity; insulin; determination of glucose in cell culture media; insulin-dependent glucose uptake

For citation: Afanasyeva A.N., Saparova V.B., Makarenko I.E., Drai R.V., Selenskikh T.A. Experimental validation of an *in vitro* method for assessing insulin-dependent glucose uptake. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):77–88. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-398>

Введение

Валидация биоаналитической методики — это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач. Соблюдение принципов валидации обеспечивает надежность данных, получаемых в процессе разработки и экспертизы

качества лекарственных препаратов на рынке как химических, так и биологических препаратов¹. Подходы к валидации биоаналитических и химических методик различаются. В руководствах Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) по валидации биоаналитических

¹ ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. EMA; 2006. Приложение № 6 к Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, утв. Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85.

методик² описаны пути разработки и валидации методик количественного определения действующего вещества в биологической жидкости (матрице) (например, методик иммуноферментного анализа), однако отсутствуют прямые указания на возможность трансфера этого метода для валидации методик определения биологической/метаболической/митогенной активности препарата *in vitro*.

В методике оценки инсулинозависимого захвата глюкозы используется миогенная линия клеток L6J1 — субклон материнской линии L6, которую выделил Д. Яффе из первичных культур мышц бедра крысы [1]. При смене богатой сывороткой среды на бедную миобласты L6J1 дифференцируются — клетки сливаются с образованием многоядерных миотубул, представляющих собой *in vitro* модель поперечнополосатой мускулатуры. Дифференцировка определяется по изменению морфологии клеток: появляются видимые мышечные волокна, мультиядерные клетки, при этом возникает способность экспрессировать переносчик глюкозы GLUT4 [2–4]. В обычных условиях при низкой концентрации инсулина большинство молекул GLUT4 отделены от цитоплазматической мембраны в виде внутриклеточных везикул, но посредством внутриклеточной каскадной реакции инсулин стимулирует транслокацию (перемещение) белков — переносчиков глюкозы к цитоплазматической мембране, где они закрепляются, образуя комплексы [5–8]. Наиболее важным среди механизмов влияния инсулина на метаболизм глюкозы является регуляция активности транспортера GLUT4 и, следовательно, поглощения глюкозы [9]. Перечисленные эффекты позволяют использовать дифференцированные клетки линии L6J1 в качестве тест-системы для оценки активности инсулиновых продуктов.

Точное определение концентрации глюкозы на клеточном уровне затруднительно по причине экономической неэффективности методов (в том числе сложностей манипуляций с клеточной линией, необходимости оснащения дорогостоящим оборудованием и пр.). В настоящем исследовании рассматривается способ определения аналита глюкозооксидазным (GOx) методом. Метод основан на окислении глюкозы в присутствии глюкозооксидазы с образованием эквивалентного количества пероксида водорода, которая, в свою очередь, в присутствии пероксидазы окисляет детектируемое вещество (хромоген) [10, 11].

Цель работы — валидация методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы на дифференцированных миоцитах крысы линии L6J1 в качестве тест-системы и оценка пригодности набора ГЛЮКОЗА GOD-PAP для определения глюкозы в культуральной среде.

Материалы и методы

Исследуемая методика оценки инсулинозависимого захвата глюкозы состоит из двух этапов: *in vitro* стимуляция инсулинозависимой клеточной культуры и определение концентрации глюкозы в культуральной жидкости с помощью коммерческого набора ГЛЮКОЗА GOD-PAP (НПФ «Абрис+»). Выбор набора реагентов для определения концентрации глюкозы в культуральной среде обусловлен оптимальным соотношением цена/качество, доступностью для приобретения на территории России, а также достаточной стабильностью реагентов, входящих в его состав.

Культура клеток. В исследовании использовали клеточную линию скелетной мышцы крысы сублинии L6J1 (Российская коллекция клеточных культур Института цитологии РАН. Коллекция культур клеток позвоночных). Для рутинного культивирования использовали полную питательную среду DMEM с феноловым красным и содержанием глюкозы 4,5 г/л (25 ммоль/л) (ООО «БиолоТ», арт. 1.3.5) в присутствии 10% эмбриональной бычьей сыворотки, далее FBS (Capricorn Scientific, арт. FBS-11A). В эксперименте использовали клетки до 20 пассажа с подтвержденным отсутствием микоплазмы.

Дифференцировка клеточной линии. Для дифференцировки культуру L6J1 рассевали в стерильные 96-луночные планшеты в питательной среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л (25 ммоль/л) с добавлением 2% лошадиной сыворотки (ООО «БиолоТ», арт. 1.1.5.2) и смеси антибиотиков пенициллин G — 50000 ед./фл., стрептомицин — 50 мкг/фл. (ООО «БиолоТ», арт. 1.3.18). Клетки культивировали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 7 сут. Изменения морфологии клеток линии L6J1 в процессе дифференцировки фиксировали с помощью флуоресцентного микроскопа Evos® FL (Life Technologies) (рис. 1).

Стимуляция препаратами. В исследовании были протестированы препараты производства ОАО «ГЕРОФАРМ» РинФаст®, плацебо к инсулину аспарт (данный препарат не содержал действующего вещества (инсулин аспарт), состав вспомогательных веществ был аналогичен

² Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**. EMA; 2011.
ICH Guideline M10 on bioanalytical method validation. EMA; 2019.

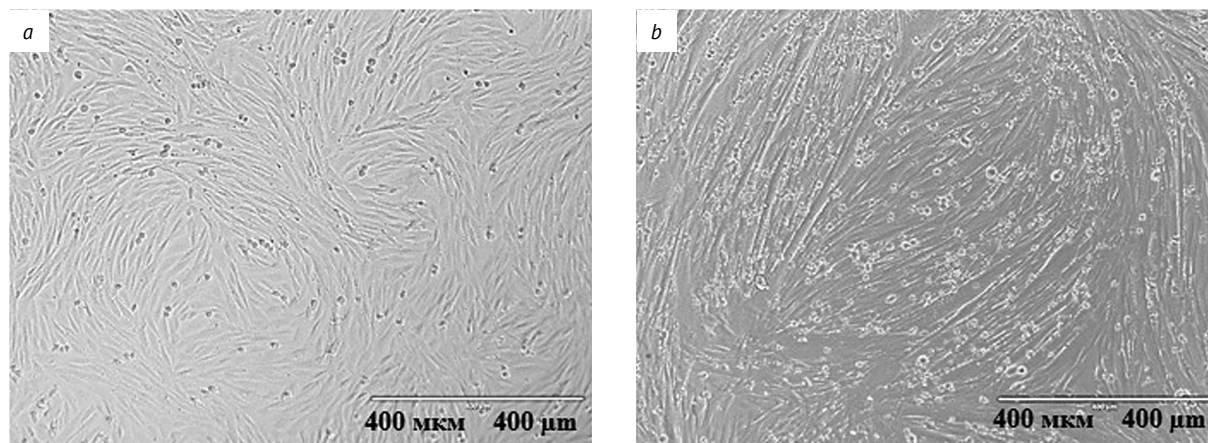


Рис. 1. Морфология клеток линии L6J1. *a* – миобласты скелетной мускулатуры крысы, недифференцированное состояние; *b* – миоциты, дифференцированная культура, наблюдаются миотубулы, *in vitro* модель поперечнополосатой мускулатуры

Fig. 1. L6J1 cell morphology: undifferentiated rat skeletal myoblasts (*a*) and a differentiated myocyte culture with visible myotubes, an *in vitro* model of striated muscles (*b*)

лекарственному препарату) и раствор инсулина человека для культур клеток (Sigma-Aldrich, кат. № I9278), который представляет собой генно-инженерный инсулин человека. Образцы тестировали в 8 концентрационных точках: 1; 10; 50; 100; 250; 400; 800; 1600; 2500 нМ, тест на специфичность методики выполняли с использованием растворов с концентрациями 0,01; 0,1; 1; 10; 50; 250; 500; 2000; 5000 нМ, что не противоречит критериям оценки, так как проводили сравнение внутри одной аналитической серии двух разных препаратов. При проведении экспериментов с плацебо использовали растворы с разведениями, соответствующими аналогичным разведениям готовой лекарственной формы.

Внесение объектов испытания в среду с содержанием глюкозы 25 ммоль/л проводили на 7 сут с момента начала эксперимента в дифференцированные клетки. После чего клетки инкубировали с исследуемыми объектами в течение 3 сут в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Определение уровня глюкозы проводили на 10 сут с момента начала эксперимента.

Определение концентрации глюкозы проводили в клеточной культуральной среде после инкубации с препаратом при помощи коммерчески доступного набора реагентов ГЛЮКОЗА GOD-PAP (НПФ «Абрис+», кат. № 304.3.250) путем определения оптической плотности (ОП) на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech) при длине волны 504 нм.

Во все лунки полистиролового 96-луночного планшета вносили по 250 мкл ферментативного

буферного раствора, содержащего 15000 МЕ/л глюкозооксидазы и 1000 МЕ/л пероксидазы, а также по 2,5 мкл образцов, калибровочных проб и нулевой пробы. Инкубировали 15 мин при 37 °С при 250 об./мин на планшетном шейкере ELMI Skyline ST-3L (ELMI Ltd.).

Для оценки линейности и чувствительности определения глюкозы в качестве образца глюкозы использовали калибраторы, приготовленные из реагента «глюкоза безводная» (не менее 99,5%, АО «ЛенРеактив», кат. № 040668) с концентрацией 1; 2; 3; 4; 5; 10; 15; 20; 25 и 30 ммоль/л. В качестве образцов контроля качества использовали калибратор набора, содержание глюкозы 5,5 ммоль/л.

Валидационные параметры. Критерии валидации были подобраны согласно Государственной фармакопее Российской Федерации, рекомендациям Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) и ЕМА. Процедура валидации включала оценку специфичности методики, устойчивости и прецизионности, в качестве дополнительной характеристики был проведен тест на различие инсулиновых продуктов. Проведена оценка линейности, чувствительности, правильности и прецизионности при использовании набора ГЛЮКОЗА GOD-PAP.

Для оценки специфичности рассмотрен ответ дифференцированных клеток линии L6J1 на стимуляцию растворами РинФаст® и плацебо препарата РинФаст® в соответствующих

концентрациях. Критерием приемлемости методики было установлено отличие не менее чем в 2 раза по остаточному уровню глюкозы в культуральной среде в максимальной концентрации препарата.

Прецизионность оценивали по показателям сходимости и внутрилабораторной прецизионности. Для определения сходимости проанализированы результаты, полученные при одних и тех же условиях, в течение короткого промежутка времени: анализ проводил один исполнитель, используя одни и те же реактивы и оборудование, в один день в нескольких повторностях. В качестве критерия приемлемости был принят коэффициент вариации (CV) $\leq 20\%$. Внутрилабораторную прецизионность оценивали по результатам, полученным при проведении теста разными исполнителями либо одним исполнителем в разные дни. Описанный подход позволил оценить как общую внутрилабораторную прецизионность методики, так и междневную прецизионность и прецизионность при смене исполнителя, а также степень влияния каждого из двух факторов. Критерием приемлемости для параметра внутрилабораторной прецизионности был принят $CV \leq 20\%$.

Оценку устойчивости ответа тест-системы проводили по совокупности результатов, полученных при изменении условий проведения эксперимента. Характеристикой близости независимых результатов индивидуальных испытаний, полученных в установленных, но не идентичных условиях, являлся критерий $CV \leq 25\%$.

Линейность и чувствительность определения глюкозы в клеточной культуральной среде оценивали для диапазона концентраций 1,0–30,0 ммоль/л, данный диапазон был указан как линейный в инструкции к набору. Линейность сохраняется для не менее четырех ненулевых калибровочных точек в диапазоне концентраций $(1,0–30,0) \pm 15\%$ ммоль/л, для верхнего и нижнего предела количественного определения (ВПКО и НПКО) $\pm 20\%$. Критерием приемлемости для параметра чувствительности является $CV \leq 20\%$ для точек с минимальной концентрацией. Критерий приемлемости для параметра правильности: полученное значение должно составлять 85–115% (80–120% для НПКО) от номинальной концентрации.

Статистическая обработка данных. Анализ данных проводили, используя программное обеспечение MARS Data Analysis Software 3.01 R2 для мультимодального микропланшетного ридера CLARIOstar®. Концентрацию

раствора глюкозы определяли по калибровочному графику зависимости ОП от концентрации раствора глюкозы в диапазоне концентраций, соответствующем критериям линейности и чувствительности методики. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения Prism 9 (GraphPad Software). Данные нормировали, за 100% принимали уровень глюкозы в клеточной культуральной среде без внесения исследуемых препаратов, за 0% – уровень глюкозы в клеточной культуральной среде с максимальной концентрацией инсулина. Концентрация глюкозы в культуральной среде соответствовала линейному диапазону методики 1–25 ммоль/л. По полученным данным строили пятипараметрическую кривую зависимости концентрации глюкозы (X) в среде от концентрации препарата для подсчета величины полумаксимального ингибирования IC_{50} (концентрация инсулина, при которой достигается 50% снижения концентрации глюкозы в среде). Для полученных данных рассчитаны средние арифметические значения и соответствующие стандартные отклонения (SD).

Результаты и обсуждение

Специфичность тест-системы, используемой в биоаналитической методике, определяется возможностью с ее помощью достоверно отличать действующее вещество от примесных соединений, продуктов его деградации и вспомогательных веществ.

В рамках проведенной валидации проанализировали ответ клеточной линии L6J1 на стимуляцию растворами РинФаст® и плацебо препарата РинФаст® (рис. 2, табл. 1). При внесении в среду препарата РинФаст® уровень глюкозы снижается до 22,2–24,1% от исходного уровня, что свидетельствует о стимуляции захвата глюкозы клетками. Содержание глюкозы в образце при внесении плацебо РинФаст® в максимальной концентрации не изменилось, что свидетельствует о сохранении глюкозы в среде в неизменном виде, а следовательно, об отсутствии захвата глюкозы клеткой. Незначительное снижение количества глюкозы (до 82,6% от начального) в образцах, содержащих раствор плацебо РинФаст® в низких концентрациях, может быть связано с вариабельностью методики или, возможно, с действием входящих в состав плацебо вспомогательных веществ.

Различия между максимальным и минимальным показателем содержания глюкозы в растворах, содержащих плацебо РинФаст®, составили

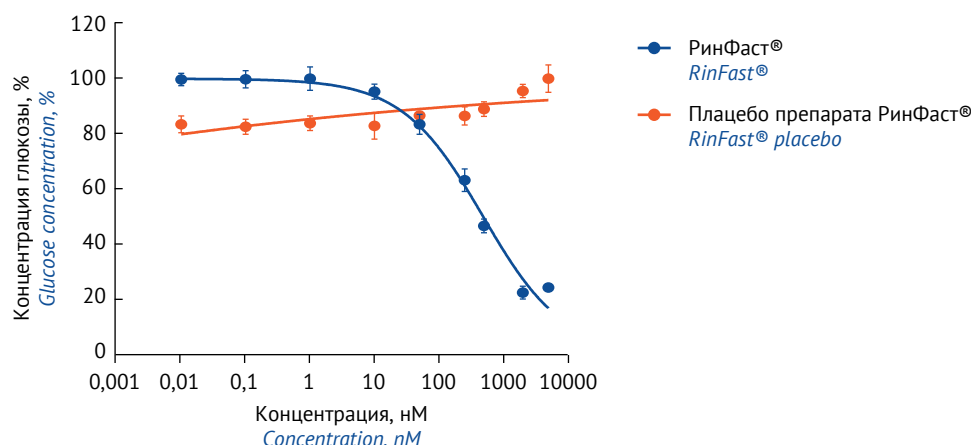


Рис. 2. Специфичность ответа клеточной линии L6J1. Зависимость концентрации глюкозы в среде от концентрации исследуемых препаратов, нормированные данные представлены в виде $\bar{X} \pm SD$

Fig. 2. Specificity of the L6J1 cell line response. Glucose concentrations in the medium are plotted as a function of test product and placebo concentrations; normalised data are presented as $\bar{X} \pm SD$

17,4%, в то время как в растворах РинФаст® – 77,8%. Таким образом, методику можно считать специфичной по критерию приемлемости: концентрация глюкозы в образцах, содержащих препарат РинФаст® и плацебо РинФаст® в концентрации 5 мкМ, отличается более чем в 4 раза.

Прецизионность характеризует степень близости результатов индивидуальных независимых испытаний, полученных в конкретных установленных условиях. Эта характеристика зависит от случайных факторов и выражается величиной стандартного отклонения — коэффициентом

вариации. Экстремальные показатели прецизионности — сходимость и воспроизводимость. Во всех экспериментах для стимуляции захвата глюкозы использовали РинФаст® в диапазоне концентраций 0–2500 нМ. Оценку прецизионности методики проводили по значению IC_{50} .

Сходимость (повторяемость, межпланшетная вариабельность) характеризует степень согласованности результатов измерений, полученных одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же исследователем, с использованием

Таблица 1. Оценка специфичности ответа клеточной линии L6J1 на введение РинФаст® и плацебо РинФаст®

Table 1. Evaluation of the specificity of L6J1 cell line responses to RinFast® and its placebo

Концентрация препаратов, нМ <i>Product concentration, nM</i>	РинФаст® <i>RinFast®</i>		Плацебо РинФаст® <i>RinFast® placebo</i>	
	Остаток глюкозы в среде <i>Residual glucose in the medium</i>			
	$(\bar{X} \pm SD)$, ммоль/л <i>($\bar{X} \pm SD$), mmol/L</i>	Нормированные данные, % <i>Normalised data, %</i>	$(\bar{X} \pm SD)$, ммоль/л <i>($\bar{X} \pm SD$), mmol/L</i>	Нормированные данные, % <i>Normalised data, %</i>
0	16,2 ± 0,7	100	16,6 ± 1	100
0,01	16,5 ± 0,4	99,7	17 ± 0,6	83,4
0,1	16,5 ± 0,5	99,8	16,9 ± 0,6	82,6
1	16,5 ± 0,7	100	17,1 ± 0,5	83,8
10	15,8 ± 0,4	95,3	16,9 ± 1	82,9
50	13,8 ± 0,6	83,4	17,7 ± 0,4	86,7
250	10,4 ± 0,7	63,1	17,7 ± 0,7	86,5
500	7,7 ± 0,4	46,5	18,2 ± 0,6	89,0
2 000	3,7 ± 0,4	22,2	19,5 ± 0,5	95,5
5 000	4 0 ± 0 3	24 1	20 4 ± 1	100

Примечание. Концентрация глюкозы представлена в виде средних значений ($\bar{X}$) в 8 повторностях.
Note. Glucose concentrations are presented as mean values ($\bar{X}$) for 8 replicates.

одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени.

В рамках проведенной валидации была оценена межпланшетная сходимость по результатам 5 независимых тестов (табл. 2). Сходимость методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы клетками линии L6J1 по результатам независимых испытаний составила от 4 до 9%, что удовлетворяет критериям приемлемости.

Внутрилабораторная прецизионность оценивается в условиях работы одной лаборатории с изменением условий проведения эксперимента. В рамках валидации проанализировали внутрилабораторную прецизионность методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы клетками линии L6J1 с изменением двух ключевых условий проведения анализа: день постановки эксперимента и исполнитель (табл. 3, 4). Внутрилабораторная прецизионность составляет 11–16%, больший вклад в разброс данных вносит смена исполнителя.

Устойчивость (робастность) валидируемой методики – способность сохранять установленные в оптимальных (номинальных) условиях характеристики при вероятных небольших изменениях условий проведения анализа. Устойчивость методики определения инсулинозависимого захвата глюкозы на тест-системе дифференцированных миоцитов линии клеток крысы L6J1 оценивали в 4 независимых экспериментах, проводившихся в 2 различных временных периодах с участием 3 исполнителей (9 полных аналитических серий). В каждом тесте меняли номер пассажа, степень конфлюэнтности клеток линии L6J1 и конфлюэнтность клеток перед рассевом: использованы пассажи от 1 до 15 с конфлюэнтностью клеток 80–100%. Во всех экспериментах для стимуляции захвата глюкозы использовали РинФаст® в диапазоне концентраций 0–2500 нМ. Оценку устойчивости проводили по значению IC_{50} (рис. 3, табл. 5).

По результатам четырех независимых экспериментов коэффициент вариации для методики

Таблица 2. Оценка сходимости методики определения инсулинозависимого захвата глюкозы с использованием тест системы L6J1

Table 2. Evaluation of the repeatability of the procedure for assessing insulin-dependent glucose uptake in the L6J1 test system

Исполнитель <i>Analyst</i>	<i>n</i>	IC_{50} , нМ <i>IC_{50}, nM</i>	Среднее IC_{50} , нМ <i>Mean IC_{50}, nM</i>	Коэффициент вариации, CV, % <i>Coefficient of variation CV, %</i>
1	3	246,3	255,7	4
		266,5		
		254,3		
1	2	331,5	311,3	9
		291,1		

Примечание. *n* – количество проведенных тестов (количество проанализированных планшетов) внутри одной аналитической серии. Для каждого теста (планшета) значение IC_{50} рассчитывалось по массиву из 8 повторностей для каждой точки концентрации.

Note. *n* – number of tests performed (plates analysed) within one analytical run. The IC_{50} value for each test (plate) was calculated from 8 replicates for each concentration point.

Таблица 3. Оценка внутрилабораторной прецизионности (разные дни) методики определения инсулинозависимого захвата глюкозы с использованием тест системы L6J1

Table 3. Evaluation of the intralaboratory precision (different days) of the procedure for assessing insulin-dependent glucose uptake in the L6J1 test system

Дата проведенного исследования <i>Testing date</i>	<i>n</i>	IC_{50} , нМ <i>IC_{50}, nM</i>	Среднее IC_{50} , нМ <i>Mean IC_{50}, nM</i>	Коэффициент вариации, CV, % <i>Coefficient of variation CV, %</i>
25.02.2020–06.03.2020	1	265,7	275,9	11
10.03.2020–20.03.2020	3	246,3		
		266,5		
		254,3		
17.03.2020–27.03.2020	2	331,5		
		291,1		

Примечание. *n* – количество проведенных тестов (проанализированных планшетов) внутри одной аналитической серии. Для каждого теста (планшета) значение IC_{50} рассчитывали по массиву из 8 повторностей для каждой точки концентрации.

Note. *n* – number of tests performed (plates analysed) within one analytical run. The IC_{50} value for each test (plate) was calculated from 8 replicates for each concentration point.

Таблица 4. Оценка внутрिलाбораторной прецизионности (разные исполнители) методики определения инсулинозависимого захвата глюкозы с использованием тест системы L6J1

Table 4. Evaluation of the intralaboratory precision (different analysts) of the procedure for assessing insulin-dependent glucose uptake in the L6J1 test system

Исполнитель <i>Analyst</i>	<i>n</i>	IC ₅₀ , нМ <i>IC₅₀, nM</i>	Среднее IC ₅₀ , нМ <i>Mean IC₅₀, nM</i>	Коэффициент вариации, CV, % <i>Coefficient of variation CV, %</i>
1	2	331,5	279,2	16
		291,1		
2	2	306,3		
		281,3		
3	2	267,8		
		197,1		

Примечание. *n* – количество проведенных тестов (проанализированных планшетов) внутри одной аналитической серии. Для каждого теста (планшета) значение IC₅₀ рассчитывали по массиву из 8 повторностей для каждой точки концентрации.

Note. *n* – number of tests performed (plates analysed) within one analytical run. The IC₅₀ value for each test (plate) was calculated from 8 replicates for each concentration point.

оценки инсулинозависимого захвата глюкозы с использованием клеточной линии L6J1 в качестве тест-системы составляет 14%, что отвечает критериям устойчивости методики.

Различение инсулиновых продуктов. Проведен эксперимент, подтверждающий возможность различать инсулиновые продукты, отличающиеся модификацией молекулы, с помощью валидируемой методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы. Стимуляцию проводили растворами РинФаст® и препарата генно-инженерного инсулина человека для культур клеток в диапазоне концентраций 0–2500 нМ в трех аналитических сериях. Результаты оценивали по значению IC₅₀ (рис. 4, табл. 6).

Ответ тест-системы дифференцированных миоцитов линии L6J1 позволяет специфично

различать инсулиновые продукты, что делает методику применимой для оценки биологической активности препаратов инсулина.

При проведении валидации методики определения инсулинозависимого захвата глюкозы была доказана специфичность, прецизионность и устойчивость клеточной линии L6J1 в качестве тест-системы, методика является пригодной для детектирования биологической активности препаратов инсулина в исследованиях *in vitro*.

Линейность методики была оценена во всем исследуемом диапазоне концентраций (рис. 5, табл. 7). Коэффициент детерминации для полученной зависимости ОП от концентрации глюкозы составил 0,9983. Калибровочную кривую можно считать линейной в диапазоне концентраций 1–30 ммоль/л.

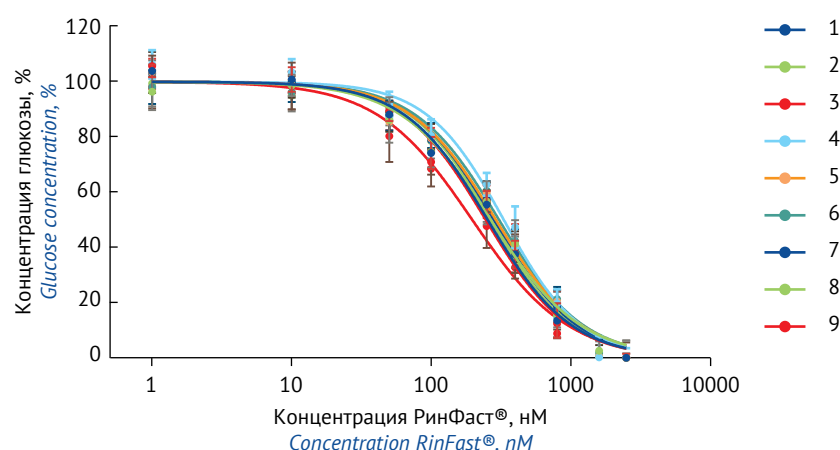


Рис. 3. Устойчивость метода оценки инсулинозависимого захвата глюкозы клетками L6J1. Зависимость концентрации глюкозы в среде от концентрации РинФаст®, нормированные данные представлены в виде $\bar{X} \pm SD$. Условные обозначения в легенде соответствуют порядковому номеру эксперимента в таблице 5

Fig. 3. Robustness of the procedure for assessing insulin-dependent glucose uptake by L6J1 cells. Glucose concentrations in the medium are plotted as a function of RinFast® concentrations; normalised data are presented as $\bar{X} \pm SD$. The legend shows numbers of the experiments described in Table 5

Таблица 5. Оценка устойчивости методики определения инсулинозависимого захвата глюкозы с использованием тест системы L6J1

Table 5. Evaluation of the robustness of the procedure for assessing insulin-dependent glucose uptake in the L6J1 test system

№	Дата проведения эксперимента <i>Testing date</i>	Исполнитель <i>Analyst</i>	<i>n</i>	IC ₅₀ , нМ <i>IC₅₀, nM</i>	Пассаж <i>Passage</i>	Конфлюэнт- ность, % <i>Confluence, %</i>	Среднее IC ₅₀ , нМ <i>Mean IC₅₀, nM</i>	Коэффициент вариации, CV, % <i>Coefficient of variation, CV, %</i>
1	10.03.2020– 20.03.2020	1	3	246,3	15	100	271,4	14
2				266,5				
3				254,3				
4	17.03.2020– 27.03.2020	1	2	331,5	3	80		
5				291,1				
6	17.03.2020– 27.03.2020	2	2	306,3	1	95		
7				281,3				
8	17.03.2020– 27.03.2020	3	2	267,8	1	95		
9				197,1				

Примечание. n – количество проведенных тестов (количество проанализированных планшетов) внутри одной аналитической серии. Для каждого теста (планшета) значение IC₅₀ рассчитывали по массиву из 8 повторностей для каждой точки концентрации.

Note. n – number of tests performed (plates analysed) within one analytical run. The IC₅₀ value for each test (plate) was calculated from 8 replicates for each concentration point.

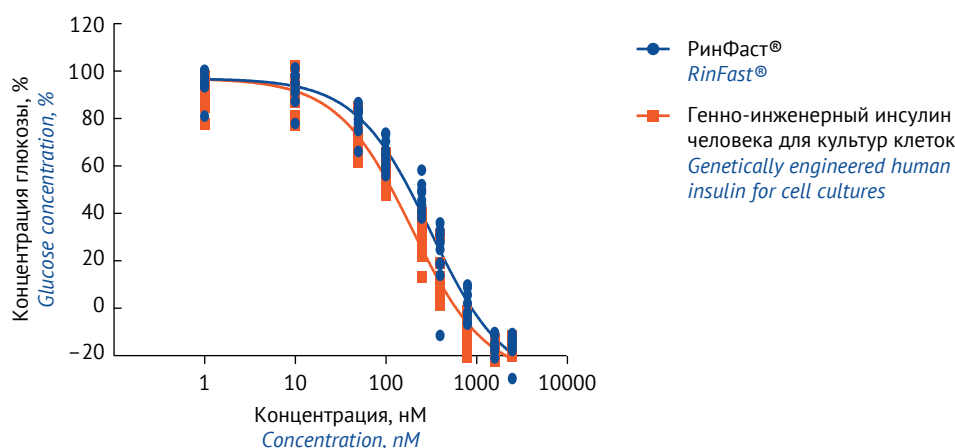


Рис. 4. Зависимость концентрации глюкозы в среде с клетками L6J1 от концентрации вносимого препарата. Данные представлены в виде индивидуальных точек для каждого повтора, всего по 8 повторам для каждой концентрации препарата

Fig. 4. Glucose concentrations in the medium as a function of RinFast® concentrations. Data are presented as individual points for each replicate, with a total of 8 replicates for each product concentration

Таблица 6. Результаты расчета концентрации инсулинового препарата, при которой достигается 50% снижения концентрации глюкозы в среде (IC₅₀)

Table 6. Results of calculating the Insulin product concentration causing a 50% decrease in the concentration of glucose in the medium (IC₅₀)

Инсулиновый препарат Insulin product	IC ₅₀ , нМ IC ₅₀ , nM	Среднее IC ₅₀ , нМ Mean IC ₅₀ , nM	Коэффициент вариации, CV, % Coefficient of variation, CV, %
РинФаст® RinFast®	217,9	249,9	13
	282,0		
	249,8		
Генно-инженерный инсулин человека Genetically engineered human insulin	183,1	176,0	4
	173,0		
	171,8		

Примечание. Значение IC₅₀ рассчитывали по массиву из 8 повторностей для каждой точки концентрации.

Note. The IC₅₀ value was calculated from 8 replicates for each concentration point.

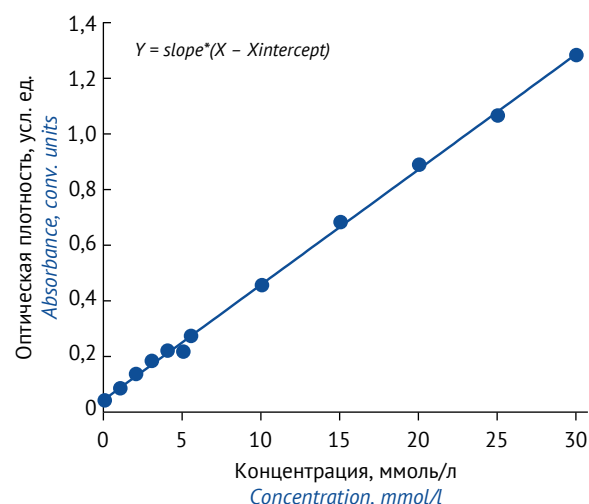


Рис. 5. Зависимость оптической плотности при 504 нм от концентрации глюкозы в среде. Значения оптической плотности представлены в виде $\bar{X} \pm SD$

Fig. 5. The absorbance at 504 nm as a function of glucose concentrations in the medium. Absorbance values are presented as $\bar{X} \pm SD$

Результаты измерений удовлетворяли критериям приемлемости в линейном диапазоне 1,0–30,0 ммоль/л. НПКО методики составляет 1 ммоль/л, чувствительность установлена на уровне НПКО (1 ммоль/л).

Для оценки правильности измерений с помощью набора ГЛЮКОЗА GOD-PAP были проанализированы независимые образцы контроля качества на трех уровнях концентраций

глюкозы, соответствующих низкому – 1 мМ, среднему – 10 мМ и высокому уровню – 25 мМ (табл. 8).

Значения концентрации глюкозы в культуральной среде составили 95–107% от номинального значения, что соответствует критериям приемлемости.

Закключение

Методика оценки инсулинозависимого захвата глюкозы с использованием клеточной линии L6J1 в качестве тест-системы валидирована и может применяться для определения метаболической активности инсулинов в исследованиях разработки препаратов, биоэквивалентности, сопоставимости и выпускающем контроле качества лекарственных препаратов. Набор ГЛЮКОЗА GOD-PAP является пригодным для определения концентрации глюкозы в культуральной среде и может быть использован для оценки инсулинозависимого захвата глюкозы.

Предложенный методологический подход к валидации биоаналитических методик на примере оценки методики по определению инсулинозависимого захвата глюкозы в дальнейшем может быть использован при разработке методических рекомендаций по валидации биологических методик определения метаболической активности препаратов или для внесения соответствующих разделов в нормативные документы.

Таблица 7. Результаты обратного расчета калибровочных образцов для оценки линейности методики

Table 7. Results of back-calculation of calibration samples to evaluate the procedure's linearity

Номинальная концентрация глюкозы, мМ <i>Nominal glucose concentration, mM</i>	Концентрация глюкозы, рассчитанная по калибровочному уравнению, мМ <i>Glucose concentration calculated from the calibration equation, mM</i>			Среднее значение концентрации глюкозы, мМ <i>Mean glucose concentration, mM</i>	Коэффициент вариации, CV, % <i>Coefficient of variation, CV, %</i>
0,0	–	–	–	–	–
1,0	0,95	1,02	0,95	0,97	4
2,0	2,59	2,03	2,02	2,21	15
3,0	3,15	3,21	3,72	3,36	9
4,0	4,31	3,70	4,46	4,16	10
5,0	4,31	3,70	4,46	4,16	10
10,0	9,84	9,97	10,11	9,97	1
15,0	15,34	15,48	15,63	15,48	1
20,0	20,32	20,68	20,39	20,46	1
25,0	24,57	24,82	24,86	24,75	1
30,0	29,73	29,74	30,56	30,01	2

Примечание. «–» – значения не рассчитаны из-за чувствительности методики.

Note. – these values were not calculated because of the procedure's sensitivity.

Таблица 8. Результаты по оценке правильности методики определения концентрации глюкозы в культуральной среде

Table 8. Results of evaluating the accuracy of the procedure for determining the concentration of glucose in the culture medium

Уровень концентрации глюкозы <i>Glucose concentration level</i>	Номинальная концентрация, мМ <i>Nominal concentration, mM</i>	Найдено $\bar{X}$, мМ <i>Determined $\bar{X}$, mM</i>	Открываемость, % <i>Recovery, %</i>
Низкий <i>Low</i>	1	0,95	95
		1,02	102
		0,95	95
Средний <i>Medium</i>	10	9,97	100
		9,88	99
		10,11	101
Высокий <i>High</i>	25	26,71	107
		26,51	106
		24,86	99

Примечание. Среднее значение рассчитывали из трех измерений для каждой концентрации.

Note. Mean values were calculated from three measurements for each concentration.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Yaffe D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1968;61(2):477–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.61.2.477>
2. Mandel JL, Pearson ML. Insulin stimulates myogenesis in a rat myoblast line. *Nature*. 1974;251(5476):618–20. <https://doi.org/10.1038/251618a0>
3. Jacobs FA, Bird RC, Sells BH. Differentiation of rat myoblasts. Regulation of turnover of ribosomal proteins and their mRNAs. *Eur J Biochem*. 1985;150(2):255–63. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09015.x>
4. Portier GL, Benders AG, Oosterhof A, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH. Differentiation markers of mouse C2C12 and rat L6 myogenic cell lines and the effect of the differentiation medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1999;35(4):219–27. <https://doi.org/10.1007/s11626-999-0030-8>
5. Alvim RO, Cheuhen MR, Machado SR, Sousa AGP, Santos PCJL. General aspects of muscle glucose uptake. *An Acad Bras Cienc*. 2015;87(1):351–68. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140225>
6. Goodyear LJ, King PA, Hirshman MF, Thompson CM, Horton ED, Horton ES. Contractile activity increases plasma membrane glucose transporters in absence of insulin. *Am J Physiol*. 1990;258(4 Pt 1):E667–72. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1990.258.4.E667>
7. Lee AD, Hansen PA, Holloszy JO. Wortmannin inhibits insulin-stimulated but not contraction-stimulated glucose transport activity in skeletal muscle. *FEBS Lett*. 1995;361(1):51–4. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00147-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00147-2)
8. Lund S, Holman GD, Schmitz O, Pedersen O. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(13):5817–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.5817>
9. Rothman DL, Magnusson I, Cline G, Gerard D, Kahn CR, Shulman RG, Shulman GI. Decreased muscle glucose transport/phosphorylation is an early defect in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(4):983–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.983>
10. Jiang S, Zhang Y, Yang Y, Huang Y, Ma G, Luo Y, et al. Glucose oxidase-instructed fluorescence amplification strategy for intracellular glucose detection. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(11):10554–8. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b00010>
11. Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol*. 1969;22(2):158–61. <https://doi.org/10.1136/jcp.22.2.158>

Вклад авторов. А.Н. Афанасьева — написание текста, анализ и интерпретация результатов исследований, участие в выполнении экспериментов; В.Б. Сапарова — существенный вклад в концепцию работы, анализ и интерпретация результатов исследований, редактирование текста; И.Е. Макаренко — критический пересмотр содержания статьи, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; Р.В. Драй — руководство исследованием, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; Т.А. Сельменских — участие в выполнении экспериментов.

Authors' contributions. Alina N. Afanasyeva—writing of the text, analysis and interpretation of the study results, participation in the experimental work; Valeria B. Saparova—a significant contribution to the study concept, analysis and interpretation of the study results, editing of the text; Igor E. Makarenko—critical revision of the text, approval of the final version of the paper for publication; Roman V. Drai—research management, approval of the final version of the paper for publication; Tatyana A. Selmenskikh—participation in the experimental work.

Благодарности. В проведении исследования и подготовке статьи оказывали помощь коллеги из службы обеспечения качества ЗАО «Фарм Холдинг» И.С. Гиба и А.А. Батуева. Спонсорская поддержка ОАО «ГЕРОФАРМ».

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

Acknowledgements. I.S. Giba and A.A. Batueva, the authors' colleagues from the quality assurance service of Pharm-Holding, CJSC, assisted in the research and preparation of the paper. GEROPHARM, OJSC provided funding for the research.

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

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Афанасьева Алина Николаевна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1443-4294>

Alina.Afanaseva@geropharm.com

Сапарова Валерия Бяшимовна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>

Valeriya.Saparova@geropharm.com

Макаренко Игорь Евгеньевич, канд. мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>

Igor.Makarenko@geropharm.com

Драй Роман Васильевич, канд. мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>

Roman.Drai@geropharm.com

Сельменских Татьяна Алексеевна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7073-311X>

Tatyana.Selmenskikh@geropharm.com

Alina N. Afanasyeva.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1443-4294>

Alina.Afanaseva@geropharm.com

Valeria B. Saparova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>

Valeriya.Saparova@geropharm.com

Igor E. Makarenko, Cand. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>

Igor.Makarenko@geropharm.com

Roman V. Drai, Cand. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>

Roman.Drai@geropharm.com

Tatyana A. Selmenskikh.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7073-311X>

Tatyana.Selmenskikh@geropharm.com

Статья поступила 21.10.2021

После доработки 24.03.2022

Принята к печати 07.06.2022

Online first 20.07.2022

Article was received 21 October 2021

Revised 24 March 2022

Accepted for publication 7 June 2022

Online first 20 July 2022



В.М. Косман¹
 М.В. Карлина¹
 Н.М. Фаустова¹
 Е.А. Ежова²
 И.Г. Котельникова²
 В.Г. Макаров¹
 М.Н. Макарова¹

Особенности проведения биоаналитической части исследования эквивалентности биоаналогичного препарата надропарина кальция

¹ Акционерное общество «Научно-производственное объединение
«ДОМ ФАРМАЦИИ»,
Заводская ул., д. 3, к. 245, г.п. Кузьмоловский, Всеволожский р-н,
Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

² Федеральное государственное унитарное предприятие
«Московский эндокринный завод»,
Новохохловская ул., д. 25, Москва, 109052, Российская Федерация

✉ Косман Вера Михайловна; kosman.vm@doclinika.ru

РЕЗЮМЕ

Для сравнительного изучения фармакодинамики и подтверждения эквивалентности препаратов низкомолекулярных гепаринов (НМГ) согласно современным регуляторным требованиям необходимо сопоставить три фармакодинамических показателя: анти-Ха и анти-IIa активности и концентрацию ингибитора пути тканевого фактора (TFPI). **Цель работы** — анализ особенностей проведения биоаналитической части исследования эквивалентности биоаналогичного препарата надропарина кальция при подкожном введении. **Материалы и методы:** определение анти-Ха и анти-IIa активности НМГ и содержания TFPI в образцах плазмы крови человека, полученных после однократного подкожного введения тестируемого и референтного препаратов в одной дозе, выполнено с применением коммерчески доступных наборов реагентов и предварительно валидированных методик. Основные фармакодинамические параметры (суррогатные фармакокинетические маркеры): максимальная активность или концентрация ($A_{\max}$ или $C_{\max}$), время достижения максимальной активности или концентрации ($T_{\max}$), площадь под кривой «активность (концентрация) — время» (AUC), период полувыведения ($T_{1/2}$) рассчитаны внемоделным методом статистических моментов и выполнена их дальнейшая статистическая обработка. **Результаты:** полученные результаты оценки анти-Ха активности и TFPI позволили рассчитать и сопоставить фармакодинамические параметры ($A_{\max}$ или $C_{\max}$, AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$, $T_{\max}$, $T_{1/2}$), а также оценить доверительные интервалы, необходимые для подтверждения эквивалентности исследованных препаратов. Данные по значениям анти-IIa активности имели характер колебаний в пределах одного уровня, что не позволило рассчитать и сопоставить фармакодинамические параметры. **Выводы:** выявлены особенности, которые необходимо учитывать при планировании исследований фармакодинамики препаратов надропарина кальция: целесообразность разделения каждого образца при отборе с получением двух испытуемых аликвот (одна для определения анти-Ха и анти-IIa активностей, вторая — для анализа TFPI) для корректного выполнения аналитического этапа; достаточность подтверждения отсутствия мешающего влияния действующего вещества на аналитическую процедуру при валидации биоаналитических методик оценки анти-Ха активности, анти-IIa активности и содержания TFPI в плазме крови человека, валидированных в диапазоне концентраций 0,024–0,182 МЕ/мл, 0,0069–0,052 МЕ/мл и 1,56–100 нг/мл соответственно; возможность получения данных, не позволяющих рассчитать фармакодинамические параметры и сопоставить доверительные интервалы для всех трех фармакодинамических показателей. Указанные особенности могут быть характерны для других препаратов НМГ.

Ключевые слова: сравнительная фармакодинамика; биоаналогичный препарат; надропарин кальция; однократное подкожное введение; препараты низкомолекулярных гепаринов; анти-Xa активность; анти-IIa активность; ингибитор пути тканевого фактора; суррогатные маркеры концентрации

Для цитирования: Косман В.М., Карлина М.В., Фаустова Н.М., Ежова Е.А., Котельникова И.Г., Макаров В.Г., Макарова М.Н. Особенности проведения биоаналитической части исследования эквивалентности биоаналогичного препарата надропарина кальция. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(1):89–103. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-406>

V.M. Kosman¹ 
M.N. Karlina¹ 
N.M. Faustova¹ 
E.A. Ezhova² 
I.G. Kotelnikova² 
V.G. Makarov¹ 
M.N. Makarova¹ 

Considerations for the Bioanalytical Part of Equivalence Studies of Biosimilar Nadroparin Calcium

¹ Research-and-manufacturing company “HOME OF PHARMACY”
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement,
Vsevolzhsky district, Leningrad region 188663, Russian Federation

² Moscow Endocrine Plant,
25 Novokhokhlovskaya St., Moscow 109052, Russian Federation

✉ Vera M. Kosman; kosman.vm@doclinika.ru

ABSTRACT

According to current regulatory views, a comparative study of the pharmacodynamics (PD) of low molecular weight heparin (LMWH) products and confirmation of their equivalence require comparing three PD markers: the anti-Xa activity, the anti-IIa activity, and the tissue factor pathway inhibitor (TFPI) concentration. **The aim of this study** was to analyse the features specific to the bioanalytical part of an equivalence study of a nadroparin calcium biosimilar after single subcutaneous administration. **Material and methods:** the anti-Xa and anti-IIa activity values and TFPI content were determined in human plasma samples obtained after single subcutaneous administration of the test and the reference product in the same dose, using commercially available reagent kits and pre-validated assays. The authors calculated the main PD parameters (surrogate pharmacokinetic markers), namely the maximum activity or concentration ($A_{\max}$ or $C_{\max}$), time to maximum activity or concentration ($T_{\max}$), area under the activity–time (or concentration–time) curve (AUC), and half-life period ($T_{1/2}$), by means of model-independent statistical moment analysis and carried out further statistical testing of the parameters. **Results:** the anti-Xa activity and TFPI concentration results provided for the possibility of calculating and comparing the PD parameters ($A_{\max}$ or $C_{\max}$, AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$, $T_{\max}$, $T_{1/2}$) and estimating the confidence intervals that are necessary to confirm the bioequivalence of the studied products. The anti-IIa activity data had a characteristic pattern of slight fluctuations around one level, which prevented the calculation and comparison of PD parameters. **Conclusion:** the study identified specific features to consider when planning comparative PD studies of nadroparin calcium products. Firstly, it is feasible to divide samples into two test aliquots (one for anti-Xa and anti-IIa activity determination, the other for TFPI analysis) at the moment of collection in order to perform the analytical step correctly. Secondly, there is no need in full validation for the bioanalytical assays of the anti-Xa and anti-II activity and TFPI content in human plasma validated in the concentration ranges of 0.024–0.182 IU/mL, 0.0069–0.052 IU/mL and 1.56–100 ng/mL, respectively; a confirmation that the active ingredient does not interfere with the analytical procedure is adequate for the purpose. Finally, the data obtained may not allow for calculating PD parameters and comparing confidence intervals for all three markers. The listed considerations may be relevant for other LMWH products as well.

Key words: comparative pharmacodynamics; biosimilar medicinal product; nadroparin calcium; single subcutaneous administration; low molecular weight heparins; anti-Xa activity; anti-IIa activity; tissue factor pathway inhibitor; surrogate pharmacokinetic markers

For citation: Kosman V.M., Karlina M.V., Faustova N.M., Ezhova E.A., Kotelnikova I.G., Makarov V.G., Makarova M.N. Considerations for the bioanalytical part of equivalence studies of biosimilar nadroparin calcium. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):89–103. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-406>

Введение

Исследования биоэквивалентности (БЭ) воспроизведенного лекарственного препарата, направленные на доказательство его эквивалентности референтному лекарственному препарату, являются одной из значимых частей его клинического исследования и регламентированы требованиями нормативных документов¹. В качестве основного критерия биоэквивалентности используют 90% доверительный интервал для отношения средних геометрических значений исследуемых фармакокинетических параметров (максимальной концентрации, площади под фармакокинетической кривой) тестируемого лекарственного препарата (Т) и референтного лекарственного препарата (препарата сравнения, R)².

Биологические лекарственные препараты в связи со сложной и неоднородной химической структурой относят к биоаналогичным (биоподобным)³, а не воспроизведенным препаратам. Для биоподобных препаратов рационально проведение сравнительных исследований, включающих оценку фармакодинамики с использованием не общепринятых фармакокинетических параметров, а так называемых суррогатных маркеров концентрации на основе фармакодинамических показателей. При планировании, проведении и оценке результатов

такого рода исследований обычно руководствуются общими принципами исследований БЭ.

Стандартный дизайн изучения биоэквивалентности предполагает сравнение двух лекарственных препаратов в рамках рандомизированного двухпериодного, перекрестного в двух последовательностях исследования с приемом однократной дозы и периодом отмычки⁴ (клинический этап). Далее в рамках аналитического этапа в полученных пробах биологического материала проводят определение содержания действующего вещества сравниваемых препаратов с помощью заранее разработанной и валидированной биоаналитической методики. На основании полученных данных проводят расчет фармакокинетических параметров и дальнейшую статистическую обработку результатов (постаналитический или статистический этап).

Для некоторых препаратов, прежде всего биологической природы, прямая оценка концентрации действующего вещества в биоматериале затруднительна или невозможна. В этом случае могут быть использованы так называемые биологические маркеры (биомаркеры, суррогатные маркеры концентрации, конечные точки фармакокинетики)⁵. Для препаратов низкомолекулярных гепаринов (НМГ) в связи с их высокой гетерогенностью согласно современным нормативным требованиям⁶ для оценки

¹ Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. В кн.: Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М: Гриф и К; 2013. С. 174–200.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

² Там же.

³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

⁴ Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. В кн.: Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М: Гриф и К; 2013. С. 174–200.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

⁵ Guidance for Industry. Exposure-Response Relationships – Study Design, Data Analysis, and Regulatory Applications. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER); 2003.

Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins. EMEA/CHMP/BMWP/118264/2007 Rev.1. 2017.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

фармакодинамики и эквивалентности следует сопоставить анти-Ха, анти-IIa активности и концентрацию ингибитора пути тканевого фактора (tissue factor pathway inhibitor, TFPI). Данный подход был успешно применен при изучении фармакокинетики и (или) эквивалентности различных гепаринсодержащих препаратов (на основе эноксапарина, далтепарина и др.) [1–6]. Тот же принцип использован при планировании и выполнении работ по Протоколу клинического исследования № НДП-I-02/18 «Открытое рандомизированное сравнительное перекрестное исследование безопасности, переносимости и фармакодинамики препаратов Надропарин кальция, раствор для подкожного введения (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), и Фраксипарин, раствор для подкожного введения («Аспен Фарма Трейдинг Лимитед», Ирландия), у здоровых добровольцев».

Цель работы – анализ особенностей проведения биоаналитической части исследования эквивалентности, выявленных при изучении биоаналогичного препарата надропарина кальция при однократном подкожном введении.

Материалы и методы

В ходе клинического этапа работы по Протоколу клинического исследования № НДП-I-02/18 в рамках двух периодов были получены пробы плазмы крови от 26 добровольцев на 12 временных точках (через 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12 и 24 ч) после введения препаратов Т: Надропарин кальция, раствор для подкожного введения 9500 МЕ анти-Ха/мл (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия) – 7600 МЕ анти-Ха-факторной активности/0,8 мл и R: Фраксипарин, раствор для подкожного введения («Аспен Фарма Трейдинг Лимитед», Ирландия) – 7600 МЕ анти-Ха/0,8 мл.

Пробы крови были отобраны в пробирки с цитратом натрия. После получения плазмы крови путем центрифугирования при комнатной температуре (18–25 °С) в течение 15 мин при 3000 об./мин (1200 g) каждая проба была разделена на 3 части (аликвоты): 1-я часть – для определения анти-Ха и анти-IIa активности (объем не менее 0,3 мл); 2-я часть – для определения содержания TFPI (объем не менее 0,4 мл); 3-я часть – арбитражная

проба (объем не менее 0,7 мл). Такое деление необходимо, поскольку в ходе дальнейшего анализа допускается только однократное замораживание проб и определение всех трех предусмотренных фармакодинамических показателей в одной аликвоте затруднительно. Биопробы (части 1 и 2) переданы из клинического центра в аналитический с соблюдением температурного режима хранения (минус 20 °С).

Протокол биоаналитической части исследования рассмотрен и одобрен на заседании экспертной комиссии (ЭК) исследовательского учреждения, проводившего эту работу (АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», заключение ЭК № 40/20 от 28.09.2020).

Определение анти-Ха и анти-IIa активности плазмы крови человека выполнено с помощью набора реагентов «Ренапарин-тест», (НПО «Ренам», кат. № ГП-6) с использованием хромогенного субстрата. Определение концентрации TFPI в плазме крови человека выполнено методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора реагентов ELISA Kit for Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) (Cloud-Clone Corp., кат. № SEA394Hu). Работу с наборами вели согласно инструкциям производителей с предварительным подбором необходимого разведения для анализируемых проб. Кроме реагентов, входящих в состав наборов, для валидационных испытаний дополнительно использованы субстанция надропарина кальция (в качестве стандартного образца (СО)) и смесь вспомогательных веществ, входящих в состав готовой лекарственной формы (ГЛФ) препарата (плацебо препарата), предоставленные ФГУП «Московский эндокринный завод». В качестве интактной или бланк-плазмы использована референтная нормальная пулированная (РНП) плазма (ООО «Технология стандарт»), а также контрольная плазма двух уровней активности (норма и патология) из набора «Реахром-гепарин» (НПО «Ренам», кат. № ГП-1). При выполнении валидационных испытаний применены модельные смеси интактного биологического материала (РНП-плазмы крови человека) со СО, входящими в состав наборов: СО НМГ и калибровочным (стандартным) образцом TFPI (СО TFPI).

⁶ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins. EMEA/CHMP/BMWP/118264/2007 Rev.1. 2017.

Биоаналитические методики валидированы согласно рекомендациям⁷. В качестве основных валидационных параметров использованы: селективность, нижний предел количественного определения (НПКО), калибровочный диапазон, точность, прецизионность. В ходе валидационных испытаний также проверена возможность разбавления биопроб перед анализом.

Параметры фармакодинамики (суррогатные маркеры фармакокинетики: максимальная активность или концентрация $A_{\max}$ или $C_{\max}$, время достижения максимальной активности или концентрации $T_{\max}$, площадь под кривой «активность (концентрация) — время» AUC , период полувыведения $T_{1/2}$) рассчитаны внемоделным методом статистических моментов [7].

При статистической обработке данных рассчитывали средние арифметические значения ($\bar{X}$), соответствующие им стандартные отклонения (SD), стандартные ошибки среднего значения ($S_{\bar{x}}$), для фармакодинамических параметров дополнительно рассчитывали коэффициент вариации (CV , %), среднее геометрическое, медиану, максимальное и минимальное значения.

В качестве основного критерия эквивалентности препаратов Т и R использовали 90% доверительный интервал для отношения средних геометрических значений исследуемых фармакодинамических параметров ($A_{\max}$ или $C_{\max}$, AUC), полученный с предварительным преобразованием данных на основе натурального логарифма. Доверительный интервал должен быть в пределах 80–125% (или 0,8–1,25)⁸.

В связи с получением близких значений фармакодинамического показателя (анти-Иа активности) на всех временных точках у подавляющего большинства добровольцев выполнена оценка попадания значений в диапазон $\pm 3SD$ с помощью контрольной карты Шухарта⁹.

Расчет основных фармакодинамических параметров выполнен с использованием приложения PKSolver для Microsoft Office Excel. Статистический анализ выполнен с применением программ Microsoft Excel 2007 и Statistica 10.0 (StatSoft).

Непосредственное доказательство эквивалентности исследованных препаратов не входило в задачу данного исследования, поэтому материалы, касающиеся дизайна исследования, характеристик добровольцев, критериев их включения/невключения, статистического обоснования размера выборки и т.п., а также детализация результатов статистической обработки полученных данных не включены в текст работы.

Результаты и обсуждение

Процесс валидации биоаналитической методики является обязательным в практике изучения фармакокинетики, токсикокинетики и биоэквивалентности в доклинических и клинических исследованиях. Объем и требования к валидации биоаналитических методик и анализу исследуемых биологических образцов при изучении биоэквивалентности регламентированы отдельным приложением соответствующего регуляторного документа¹⁰, который дополняет более общие рекомендации по валидации биоаналитических методик¹¹.

Использование в биоаналитической работе коммерчески доступных наборов реагентов имеет ряд особенностей. На начальном этапе необходимо выполнить проверку работоспособности наборов применительно к условиям конкретной лаборатории, основанную на выполнении анализа стандартных образцов (калибраторов), входящих в состав наборов; затем оценить влияние действующего вещества и плацебо исследуемых препаратов на результаты аналитической процедуры, подтвердить наличие активности *in vitro* и провести валидационные испытания.

⁷ ICH, Q2A, Harmonised tripartite guideline, Text on validation of analytical procedures. Geneva: IFPMA; 1994.

ICH, Q2B, Harmonised tripartite guideline, Guideline on validation of analytical procedures: methodology, IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonisation. Geneva; 1996.

Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Rockville, MD; 2018.

Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. London; 2011.

⁸ Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. В кн.: Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М: Гриф и К; 2013. С. 174–200.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

⁹ ГОСТ Р 50779.42-99. Статистические методы. Контрольные карты Шухарта. М.: Стандартинформ; 2008.

¹⁰ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

¹¹ ICH, Q2A, Harmonised tripartite guideline, Text on validation of analytical procedures. Geneva: IFPMA; 1994.

ICH, Q2B, Harmonised tripartite guideline, Guideline on validation of analytical procedures: methodology, IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonisation. Geneva; 1996.

Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Rockville, MD; 2018.

Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. London; 2011.

Данные по проверке работоспособности наборов реагентов с применением коммерчески доступных контрольных плазм с различным содержанием гепарина представлены в *таблице 1*. Полученные экспериментальные данные соответствовали показателям правильности определения анти-Xa и анти-IIa активности гепарина в плазме¹², что позволило подтвердить их пригодность для дальнейших испытаний.

По результатам анализа серий растворов СО надропарина кальция и СО НМГ, входящего в состав набора «Ренапарин-тест», были получены схожие зависимости оптической плотности растворов от их анти-Xa активности (*рис. 1*). На *рисунке 2* представлены УФ-спектры, полученные при анализе интактного биоматериала (бланк-плазмы) и модельных смесей с добавками СО НМГ или СО надропарина кальция. Их сопоставление позволило сделать заключение о том, что компоненты биоматериала (плазмы крови) не искажают спектров продуктов реакции с СО надропарина кальция и СО НМГ, а также подтвердить, что оптическая плотность снижается схожим образом в присутствии как СО НМГ, так и СО надропарина кальция. Таким образом, подтверждено, что действующее вещество исследуемого препарата в эксперименте *in vitro* проявляет тот вид активности,

на котором основана его дальнейшая оценка в экспериментах *in vivo* (в данном случае сравнительная оценка фармакодинамики), что обосновывает корректность использования данного аналитического подхода для дальнейшего исследования.

Результаты анализа, полученные при определении концентрации TFPI, для растворов плацебо, СО надропарина кальция и модельных смесей плазмы крови с добавками надропарина кальция, представлены в *таблице 2*.

Установлено, что плацебо препарата и СО надропарина кальция в модельных смесях с плазмой крови не оказывают влияния на уровень TFPI *in vitro* и не оказывают мешающего влияния на определение концентрации TFPI в плазме крови человека. Увеличение концентрации TFPI-фактора при действии любого НМГ (в том числе надропарина кальция) можно зарегистрировать только *in vivo* или в специальных клеточных системах, что связано с особенностями механизма его образования и регуляции в живом организме [9].

Таким образом, подтверждено отсутствие мешающего влияния надропарина кальция на результаты определения активности анти-Xa/анти-IIa факторов и концентрации TFPI.

Таблица 1. Результаты определения активности анти-Xa и анти-IIa факторов гепарина в образцах контрольной плазмы

Table 1. Results of heparin anti-Xa and anti-IIa activity evaluation in control plasma samples

Параметры <i>Parameters</i>	Анти-Xa активность, МЕ/мл <i>Anti-Xa activity, IU/mL</i>		Анти-IIa активность, МЕ/мл <i>Anti-IIa activity, IU/mL</i>	
	контрольная плазма 1 <i>control plasma 1</i>	контрольная плазма 2 <i>control plasma 2</i>	контрольная плазма 1 <i>control plasma 1</i>	контрольная плазма 2 <i>control plasma 2</i>
Значения активности по паспорту производителя, (среднее и диапазон)* <i>Activity values according to the manufacturer's product insert (mean and range)*</i>	0,43 (0,33–0,53)	0,82 (0,72–0,92)	0,43 (0,33–0,53)	0,82 (0,72–0,92)
Экспериментально полученные значения ($\bar{X} \pm SD$) <i>Experimental values ($\bar{X} \pm SD$)</i>	0,51 $\pm$ 0,02	0,89 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,04
Коэффициент вариации результатов по паспорту производителя, % <i>Coefficients of variation for results according to the manufacturer's product insert, %</i>	10	10	10	10
Экспериментально полученные коэффициенты вариации результатов, % <i>Experimental coefficients of variation for results, %</i>	4,2	4,8	6,4	5,2

* Поскольку для нефракционированного гепарина, входящего в состав контрольных плазм из набора реагентов «Реахром-гепарин», соотношение анти-Xa/IIa активности составляет 1:1 [8], то интервал допустимых значений для активности анти-Xa и анти-IIa фактора одинаков и соответствует значению, приводимому в паспорте к набору реагентов для определения активности анти-Xa фактора (анти-Xa/мл).

* Taking into account the 1:1 ratio of anti-Xa to anti-IIa activity of unfractionated heparin from the control plasmas included into the ReaChrom-Heparin kit [8], the ranges of acceptable anti-Xa and anti-IIa activity values are the same and correspond to the range given in the insert provided with the reagent kit for determination of anti-Xa activity (anti-Xa/mL).

¹² Инструкция по применению набора реагентов для определения активности низкомолекулярного гепарина «Ренапарин-тест» (НПО «Ренам», Россия).

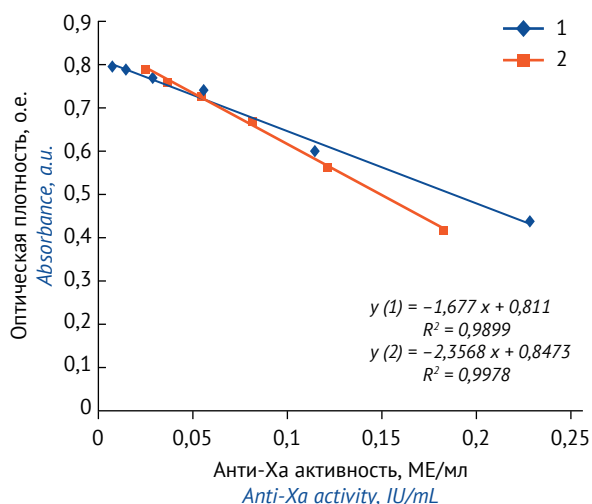


Рис. 1. Примеры калибровочных зависимостей оптической плотности растворов от анти-Ха активности СО низкомолекулярного гепарина (1) и СО надропарина кальция (2)

Fig. 1. Example calibration function of absorbance vs. anti-Xa activity of the low molecular weight heparin reference standard (1) and nadroparin calcium (2) solutions

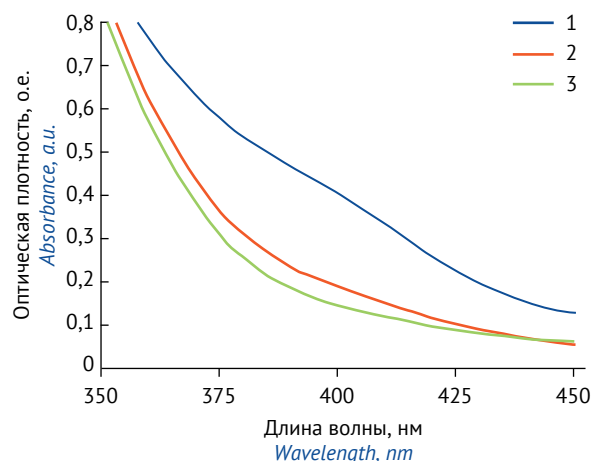


Рис. 2. Типичные УФ-спектры, полученные при анализе анти-Ха активности плазмы крови человека: 1 – бланк-плазма; 2 – модельная проба плазмы крови с добавкой стандартного образца надропарина кальция, 3 – модельная проба с добавкой стандартного образца низкомолекулярного гепарина

Fig. 2. Typical UV-spectra obtained when analysing human plasma anti-Xa activity: 1 – blank plasma, 2 – model plasma spiked with the reference standard of nadroparin calcium, 3 – model plasma spiked with the reference standard of low molecular weight heparin

Основные результаты валидации методик оценки активности анти-Ха, анти-IIa факторов и концентрации TFPI представлены в таблице 3.

Получены удовлетворительные результаты по всем необходимым валидационным параметрам для всех анализируемых показателей.

Необходимо подчеркнуть, что при выполнении валидационных испытаний использованы модельные смеси интактного биологического материала (РНП-плазмы) со СО, входящими в состав наборов (СО НМГ и СО TFPI). Применение СО надропарина кальция (действующего вещества исследованных препаратов) было

Таблица 2. Результаты определения концентрации ингибитора пути тканевого фактора (TFPI) для плацебо, растворов и модельных смесей с различными концентрациями СО надропарина кальция

Table 2. Results of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) content determination for placebo, test solutions, and model mixtures with various concentrations of nadroparin calcium RS

Испытуемый образец <i>Test sample</i>	Оптическая плотность (в растворителе для стандарта*), о.е. <i>Absorbance (in the RS solvent*), a.u.</i>	Модельные смеси с плазмой крови <i>Model plasma mixtures</i>	
		оптическая плотность, о.е. <i>absorbance, a.u.</i>	концентрация TFPI, нг/мл <i>TFPI concentration, ng/mL</i>
Растворитель для стандарта* <i>RS solvent*</i>	0,113	0,209 ± 0,005	48,5 ± 2,3
Раствор СО TFPI 1,56 нг/мл**, ** <i>TFPI RS solution 1.56 ng/mL**, **</i>	0,171	0,123 ± 0,004	1,56
Плацебо <i>Placebo</i>	0,111 ± 0,004	0,209 ± 0,005	48,5 ± 2,3
Растворы СО надропарина кальция, мкг/мл <i>Nadroparin calcium RS solution, µg/mL</i>	20,0	–	–
	4,0	0,199	44,2
	0,80	0,216	52,0
	0,16	0,189	52,8
	0,032	0,218	39,9

Примечание. СО – стандартный образец; «–» – не определялась.

* Входит в состав набора реагентов ELISA Kit for Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) (Cloud-Clone Corp., кат. № SEA394Hu).

** Концентрация раствора соответствует нижнему пределу количественного определения (НПКО).

Note. RS – reference standard; – not determined.

* The solvent is provided with the ELISA Kit for Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) (Cloud-Clone Corp., SEA394Hu).

** The concentration corresponds to the lower limit of quantification (LLOQ).

Таблица 3. Основные валидационные параметры методик определения анти-Xa, анти-IIa активности и концентрации ингибитора пути тканевого фактора (TFPI) в плазме крови человека

Table 3. Main validation parameters for assays of the anti-Xa activity, anti-IIa activity, and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) concentration in human plasma

Валидационный параметр <i>Validation parameter</i>	Уровень концентрации <i>Concentration level</i>	Критерий приемлемости <i>Acceptance criterion</i>	Результат <i>Result</i>			Вывод <i>Conclusion</i>
			анти-Xa активность, МЕ/мл <i>anti-Xa activity, IU/mL</i>	анти-IIa активность, МЕ/мл <i>anti-IIa activity, IU/mL</i>	ингибитор пути тканевого фактора, нг/мл <i>TFPI, ng/mL</i>	
Селективность <i>Selectivity</i>	Бланк-плазма, НПКО, ВПКО* <i>Blank plasma, LLOQ, ULOQ*</i>	Способность дифференцировать аналит от эндогенных компонентов матрицы и других компонентов образца <i>Ability to differentiate the analyte from the endogenous matrix and other sample components</i>	Подтверждена <i>Confirmed</i>	Подтверждена <i>Confirmed</i>	Подтверждена <i>Confirmed</i>	Соответствует <i>Conforms</i>
Нижний предел количественного определения <i>Lower limit of quantification</i>	НПКО <i>LLOQ</i>	Точность, менее 20% <i>Accuracy, ≤20%</i> Прецизионность, менее 20% <i>Precision, ≤20%</i>	0,024	0,0069	1,56	Установлен <i>Determined</i> Соответствует <i>Conforms</i> Соответствует <i>Conforms</i>
			1,5–13,1%	4,7–10,2%	8,2–12,5%	
			11,6%	14,8%	12,0%	
Калибровочный диапазон <i>Calibration range</i>	Калибровочные стандарты не менее шести концентраций, не менее 3 серий <i>Calibration standards at a minimum of 6 concentrations, at least 3 runs</i>	Коэффициент корреляции (r) $\geq 0,9$ <i>Correlation coefficient (r) ≥ 0.9</i>	0,024–0,182 $r \geq 0,99$	0,0069–0,052 $r \geq 0,99$	1,56–100 $r \geq 0,99$	Установлен <i>Determined</i> Соответствует <i>Conforms</i>
Точность** (δ), (%) <i>Accuracy**</i> , (δ), (%)	ВПКО <i>ULOQ</i>	<15	4,5–13,1	4,7–10,2	1,6–7,8	Соответствует <i>Conforms</i>
	Средний КК <i>Middle QC</i>	<15	2,5–10,2	3,6–6,7	2,9–4,2	
	Низкий КК <i>Low QC</i>	<15	0,5–12,0	1,2–13,8	8,0–13,4	
	НПКО <i>LLOQ</i>	<20	0,5–13,4	0,9–14,1	8,2–12,5	
Прецизионность в одном цикле*** (RSD, %) <i>Intra-run precision***</i> (RSD, %)	ВПКО <i>ULOQ</i>	<15	4,5–12,5	3,4–9,6	0,1–7,7	Соответствует <i>Conforms</i>
	Средний КК <i>Middle QC</i>	<15	3,6–6,5	4,1–7,8	0,4–4,2	
	Низкий КК <i>Low QC</i>	<15	5,5–7,1	2,1–5,6	1,8–13,8	
	НПКО <i>LLOQ</i>	<20	0,7–8,0	0,7–14,1	7,6–13,7	
Прецизионность между циклами*** (RSD, %) <i>Inter-run precision***</i> (RSD, %)	ВПКО <i>ULOQ</i>	<15	13,3	13,1	6,4	Соответствует <i>Conforms</i>
	Средний КК <i>Middle QC</i>	<15	6,6	6,8	4,7	
	Низкий КК <i>Low QC</i>	<15	8,6	6,5	9,0	
	НПКО <i>LLOQ</i>	<20	11,6	14,8	12,0	

Примечание. ВПКО – верхний предел количественного определения, НПКО – нижний предел количественного определения, КК – контроль качества.

* Для оценки анти-Xa активности ВПКО – 0,182 МЕ/мл, средний КК – 0,121 МЕ/мл, низкий КК – 0,539 МЕ/мл, НПКО – 0,024 МЕ/мл, для оценки анти-IIa активности ВПКО – 0,052 МЕ/мл, средний КК – 0,0347 МЕ/мл, низкий КК – 0,0154 МЕ/мл, НПКО – 0,0069 МЕ/мл, для ингибитора пути тканевого фактора ВПКО – 100 нг/мл, средний КК – 50 нг/мл, низкий КК – 3,125 нг/мл, НПКО – 1,56 нг/мл.

** Точность оценивали по принципу «внесено-найдено» как модуль относительной систематической погрешности (δ) в процентах от внесенного количества.

*** Для оценки прецизионности использована величина относительного стандартного отклонения (RSD, %).

Note. ULOQ – upper limit of quantification, LLOQ – lower limit of quantification, QC – quality control.

* For the anti-Xa activity assay, the ULOQ was 0.182 IU/mL, the middle QC level was 0.121 IU/mL, the low QC level was 0.539 IU/mL, and the LLOQ was 0.0240 IU/mL. For the anti-IIa factor activity assay, the ULOQ was 0.052 IU/mL, the middle QC level was 0.347 IU/mL, the low QC level was 0.0154 IU/mL, and the LLOQ was 0.0069 IU/mL. For the TFPI assay, the ULOQ was 100 ng/mL, the middle QC level was 50 ng/mL, the low QC level was 3.125 ng/mL, and the LLOQ was 1.56 ng/mL.

** Accuracy was estimated by recovery in absolute values of relative bias (δ) expressed as a percentage of the spiked amount.

*** Precision was evaluated using the relative standard deviation (RSD, %).

целесообразным только на начальном этапе испытаний — для подтверждения отсутствия его мешающего влияния на результаты анализа. Такая особенность валидационных испытаний связана с тем, что целью аналитической процедуры было определение не самого вещества, а специфического биомаркера (анти-Ха/анти-IIa активность НМГ, концентрация TFPI), который является откликом на введение действующего вещества. Поэтому в дальнейшем при использовании валидированных ранее методик оценки указанных показателей нерационально проводить полную валидацию для каждого нового действующего вещества группы НМГ. Целесообразно ограничиться проверкой пригодности для анализа коммерчески доступных наборов реагентов и подтверждением отсутствия мешающего влияния действующего вещества (и, по возможности, плацебо исследуемой ГЛФ) на аналитическую процедуру.

Валидированные методики определения анти-Ха, анти-IIa активности НМГ в плазме крови человека и концентрации TFPI были применены для анализа проб плазмы крови добровольцев, полученных при проведении клинического исследования. Для успешного выполнения аналитического этапа имеет значение аликвотирование проб, предусмотренное при их отборе (две части — для проведения анализов, передаваемые в аналитический центр, и одна арбитражная часть, хранящаяся в клиническом центре). Обычно при использовании биоаналитических методик с хроматографическим определением одного целевого аналита для анализа используют одну аликвоту образца плазмы крови. Согласно рекомендациям по выполнению исследований БЭ для снижения вариабельности результатов анализ всех образцов, полученных от одного субъекта на всех временных точках, предусмотренных дизайном исследования, должен быть выполнен в рамках одного аналитического цикла, т.е. в совокупности образцов, приготовленных в одно и то же время, одним аналитиком с использованием одинаковых реактивов в сходных условиях¹³. Традиционно в рамках исследования БЭ предусмотрено разделение каждого отобранного образца на две равнозначные части: испытываемую пробу и арбитражную. Данное аликвотирование проводят сразу после отбора образцов крови и получения плазмы крови, до первого замораживания образцов. Арбитражную пробу обычно хранят в клиническом центре, а испытываемую передают

для дальнейшего анализа, предусмотренного протоколом исследования. При необходимости анализа нескольких соединений или параметров, выполняемых разными методами, в разных аналитических условиях или с использованием различных процедур подготовки проб, для выполнения всего комплекса аналитических работ может потребоваться повторная заморозка/разморозка образцов. Если она недопустима, то до первой заморозки полученных образцов плазмы крови рационально предусмотреть их аликвотирование не на две части, как это принято, а на большее число частей (например, на три) с учетом особенностей дальнейшего аналитического этапа. В случае изучения фармакодинамики препаратов надропарина кальция, учитывая необходимость определения в каждом образце трех показателей и рекомендации производителей наборов реагентов, исключающие повторную заморозку проб, выполнение такой аналитической работы одновременно из одной аликвоты может быть затруднительно и привести к получению некорректных результатов. Кроме того, линейность используемых биоаналитических методик для определения анти-Ха и анти-IIa активности НМГ в плазме крови человека отличается достаточно узким диапазоном; выход за пределы диапазона линейности приводит к существенным ошибкам определения анти-Ха и анти-IIa активности. Поэтому для каждого анализируемого образца плазмы крови необходимо подбирать соответствующее разбавление проб таким образом, чтобы активность аналита находилась в пределах установленных калибровочных диапазонов методик (табл. 3). При этом разведения могут отличаться в зависимости от пути введения исследуемых препаратов, временных точек отбора проб, индивидуальных особенностей конкретных добровольцев, что обуславливает необходимость экспериментального подбора в рамках конкретного исследования. В связи с этими факторами наличие двух отдельных аликвот каждого образца (одна для определения анти-Ха и анти-IIa активности, вторая — для определения концентрации TFPI) позволяет ускорить и оптимизировать работу биоаналитической лаборатории и выполнение аналитического этапа сравнительного исследования фармакодинамики препаратов надропарина кальция. Очевидно, что указанные аналитические особенности будут характерны и для других препаратов группы НМГ, поскольку для исследования их

¹³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

эквивалентности, так же как и для надропарина кальция, необходимо определение трех обсуждаемых фармакодинамических показателей, выполняемое по тем же методикам. Следует отметить, что разделение отобранного образца не на две аликвоты, а на большее количество является непривычным для клинических центров и должно быть заранее оговорено и предусмотрено при планировании исследования. Поэтому авторы считают важным подчеркнуть выявленную особенность и акцентировать на данном вопросе внимание специалистов, отвечающих за планирование такого рода исследований (подготовку протоколов исследований), проведение их клинического этапа, но не принимающих участие в выполнении аналитических работ. Обсуждаемое аликвотирование отобранных образцов, которое следует предусмотреть и выполнить в клиническом центре, является залогом успешного выполнения аналитического этапа исследования. Корректное проведение аналитического этапа работы необходимо для получения достоверных данных и является ключевым для успешного выполнения всего исследования в целом.

При выполнении анализа проб, полученных в ходе клинического этапа, был выявлен базовый уровень (оценка диапазона выполнена на основании всех значений, полученных в «нулевых»

точках) для всех трех анализируемых показателей: для анти-Ха фактора на уровне 0,10–0,56 МЕ/мл, для анти-IIa фактора на уровне 0,14–0,65 МЕ/мл, для TFPI на уровне 12,1–77,5 нг/мл. Поскольку определяемые показатели являлись эндогенными, для каждого добровольца значения, полученные в «нулевой» точке, вычитали из значений на всех остальных временных точках¹⁴. Таким способом получены значения, которые характеризовали изменения, обусловленные экзогенными факторами (в данном случае – введением препаратов). Значения ниже базового уровня принимали равными нулю.

Усредненные фармакокинетические кривые в линейных координатах приведены на рисунке 3, средние значения фармакодинамических параметров, рассчитанные на основании полученных данных, и результаты оценки доверительных интервалов для основных фармакодинамических параметров приведены в таблице 4.

Для зависимостей активности анти-Ха фактора и концентрации TFPI от времени для препаратов Т и R наблюдали схожие по форме фармакокинетические кривые. Максимальную анти-Ха активность в плазме крови наблюдали через 3–5 ч после введения препарата, максимальную концентрацию TFPI – через 1–4 ч после введения, далее наблюдали постепенное снижение регистрируемых значений (рис. 3а и 3б

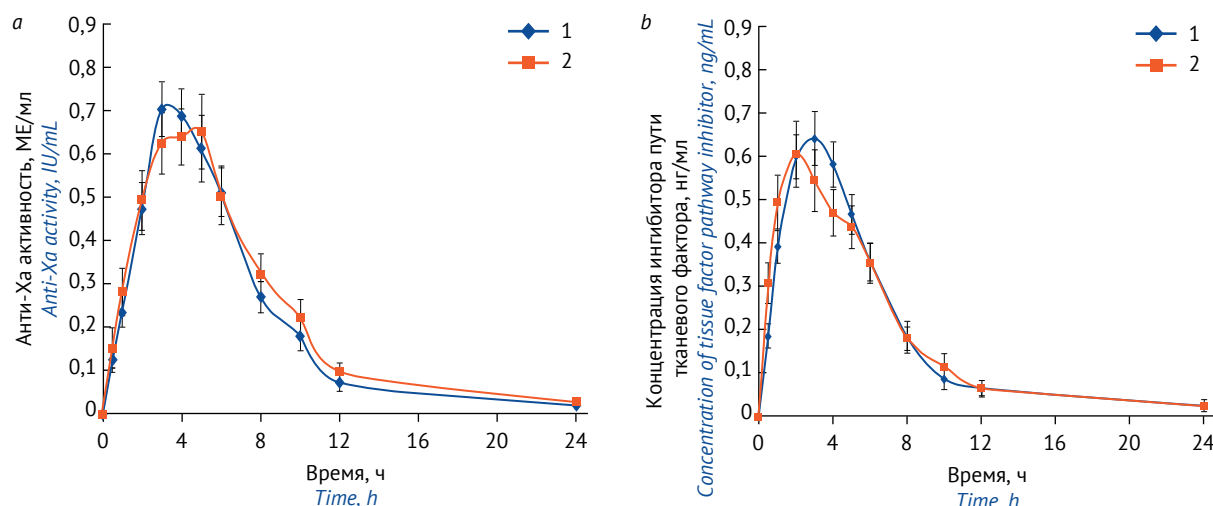


Рис. 3. Изменение анти-Ха активности (а) и содержания ингибитора тканевого фактора (б) в плазме крови после однократного подкожного введения тестируемого (1) и референсного (2) препаратов в одной дозе (число добровольцев $n = 26$, $\bar{X} \pm S_x$)

Fig. 3. Time courses for anti-Xa activity (a) and tissue factor pathway inhibitor concentration (b) in plasma after single subcutaneous administration of test (1) and reference (2) products in the same dose ($n = 26$, $\bar{X} \pm S_x$)

¹⁴ Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. В кн.: Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М: Гриф и К; 2013. С. 174–200.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

Таблица 4. Показатели фармакодинамики (суррогатные маркеры фармакокинетики) после однократного подкожного введения тестируемого и референтного препаратов в одной дозе ($n = 26$, $\bar{X} \pm SD^*$)

Table 4. Pharmacodynamic parameters (pharmacokinetic surrogate markers) after single subcutaneous administration of test and reference products in the same dose ($n = 26$, $\bar{X} \pm SD^*$)

Параметр <i>Parameter</i>	Тестируемый препарат (Т) <i>Test product (T)</i>	Референтный препарат (R) <i>Reference product (R)</i>	90% доверительные интервалы <i>90% confidence intervals</i>
Анти-Ха активность <i>Anti-Xa activity</i>			
Максимальная активность ($A_{\max}$), МЕ/мл <i>Maximum activity ($A_{\max}$), IU/mL</i>	$0,84 \pm 0,36$	$0,88 \pm 0,40$	1,0071–1,1662
Время достижения максимальной активности ($T_{\max}$), ч <i>Time to maximum activity ($T_{\max}$), h</i>	$3,9 \pm 1,3$	$4,0 \pm 1,3$	–
Площадь под кривой «активность–время» (AUC_{0-24}), ч×МЕ/мл <i>Area under the activity–time curve (AUC_{0-24}), h×IU/mL</i>	$4,87 \pm 2,45$	$5,19 \pm 2,80$	0,9876–1,1879
Площадь под кривой «активность–время» ($AUC_{0-\infty}$), ч×МЕ/мл <i>Area under the activity–time curve ($AUC_{0-\infty}$), h×IU/mL</i>	$5,19 \pm 2,77$	$5,68 \pm 3,02$	0,9657–1,1667
Период полувыведения ($T_{1/2}$), ч <i>Half-life period ($T_{1/2}$), h</i>	$3,1 \pm 2,7$	$3,8 \pm 2,1$	–
Концентрация ингибитора пути тканевого фактора <i>Concentration of tissue factor pathway inhibitor</i>			
Максимальная концентрация ($C_{\max}$), нг/мл <i>Maximum concentration ($C_{\max}$), ng/mL</i>	$72,2 \pm 27,1$	$70,1 \pm 36,6$	0,9401–1,0978
Время достижения максимальной концентрации ($T_{\max}$), ч <i>Time to maximum concentration ($T_{\max}$), h</i>	$2,8 \pm 1,0$	$2,4 \pm 1,3$	–
Площадь под фармакокинетической кривой (AUC_{0-24}), ч×нг/мл <i>Area under the pharmacokinetic curve (AUC_{0-24}), h×ng/mL</i>	$425,2 \pm 248,9$	$402,7 \pm 220,8$	0,8949–1,1029
Площадь под фармакокинетической кривой ($AUC_{0-\infty}$), ч×нг/мл <i>Area under the pharmacokinetic curve ($AUC_{0-\infty}$), h×ng/mL</i>	$474,0 \pm 338,2$	$508,1 \pm 320,4$	0,8692–1,0960
Период полувыведения ($T_{1/2}$), ч <i>Half-life period ($T_{1/2}$), h</i>	$3,2 \pm 2,8$	$3,3 \pm 2,1$	–

Примечание. «–» – оценка доверительных интервалов не предусмотрена регуляторными документами.

* Для упрощения восприятия материала в таблице не приведены значения других статистических параметров (стандартная ошибка среднего значения, коэффициент вариации, среднее геометрическое, медиана, максимум, минимум), рассчитанных согласно регуляторным требованиям.

Note. – regulatory documents do not require confidence interval assessment.

* For simplicity, the table does not show values for other statistical parameters calculated according to regulatory requirements (standard error of the mean, coefficient of variation, geometric mean, median, maximum, and minimum values).

соответственно); через 24 ч после введения анти-Ха активность составила около 3–4% от максимального уровня, концентрация TFPI – около 3,6% от максимального уровня.

Полученные результаты оценки анти-Ха активности и TFPI позволили рассчитать и сопоставить основные фармакодинамические параметры ($A_{\max}$ или $C_{\max}$, AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$, $T_{\max}$, $T_{1/2}$) исследованных препаратов, а также оценить доверительные интервалы по параметрам $A_{\max}$ или $C_{\max}$, AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$, необходимые для подтверждения эквивалентности исследованных препаратов (табл. 4).

Для анти-IIa активности при усреднении всех данных наблюдали незначительное нарастание значений во времени после введения исследованных препаратов. Уровень анти-IIa активности примерно в 4 раза ниже, чем анти-Ха

активности (отношение анти-Ха/анти-IIa активность по средним значениям активностей составило 4,2 и 4,6 для препаратов Т и R соответственно). При рассмотрении индивидуальных кривых выявлено, что анти-IIa активность после введения препаратов нарастала лишь у некоторых добровольцев; во многих случаях получены значения близкие к нулю, свидетельствовавшие скорее о колебаниях данного показателя вокруг одного уровня. Отсутствие значимого отклика по анти-IIa активности наблюдали как для тестируемого препарата, так и для препарата сравнения, что подтверждало схожее влияние исследованных препаратов на анти-IIa активность и не противоречило предположению об их эквивалентности.

Учитывая характер полученных данных, они представлены в форме контрольной карты Шухарта (рис. 4), где средняя линия

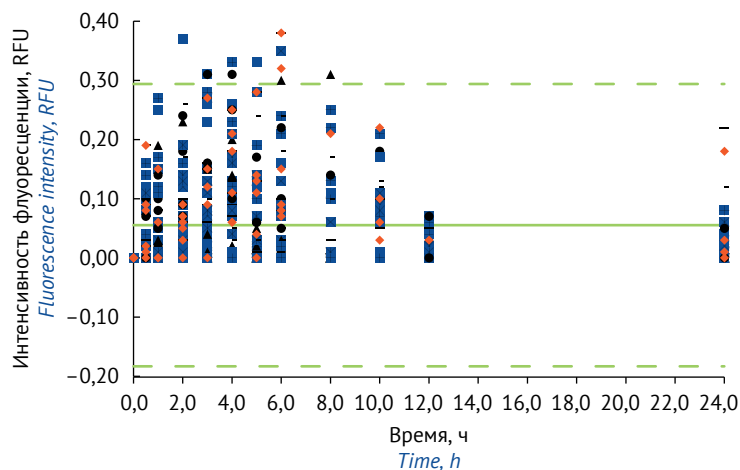


Рис. 4. Контрольная карта Шухарта анти-IIa активности в плазме крови добровольцев (после вычитания базового уровня) после однократного подкожного введения тестируемого (T ♦) и референтного (R ■) препаратов в одной дозе (объединенные данные для препаратов T и R, n = 52)

Fig. 4. Shewhart control chart for anti-IIa activity in plasma of volunteers (after baseline subtraction) after single subcutaneous administration of test (T ♦) and reference (R ■) products in the same dose (pooled T and R data, n = 52)

соответствует среднему значению, верхняя и нижняя пунктирные линии — верхней и нижней контрольной границе, определяемой как $\pm 3SD$. Попадание экспериментальных значений в указанный диапазон свидетельствует о том, что характеризующий ими процесс является стабильным с вероятностью 99,7%¹⁵.

Большинство полученных экспериментальных значений укладывались в диапазон $\pm 3SD$, что подтверждало предположение о том, что анти-IIa активность носит характер колебаний вокруг одного уровня. Поэтому дальнейший расчет и сопоставление фармакодинамических параметров на основании полученных данных по анти-IIa активности нецелесообразен.

По данным литературы, анти-Xa активность надропарина кальция приблизительно в 4 раза превосходит его анти-IIa активность [9–11]¹⁶; фармакокинетические свойства препарата «Фраксипарин форте» определяются его анти-Xa-факторной активностью, поскольку активность данного фактора выше, чем анти-IIa фактора¹⁷; низкомолекулярные гепарины, к которым относятся далтепарин натрия, надропарин кальция и эноксапарин натрия, сильнее влияют на фактор Ха, чем на фактор IIa, что приводит к более выраженному подавлению образования тромбина,

а также сильнее влияют на фактор ингибитора активатора плазминогена [12]. Авторы [13, 14] отмечают, что избирательность действия в отношении анти-Xa активности падает в ряду эноксапарин → надропарин → далтепарин → тинзапарин. Таким образом, данные литературы свидетельствуют об отсутствии выраженного влияния действующего вещества исследованных препаратов (надропарина кальция) на анти-IIa активность плазмы крови, что согласуется с полученными нами данными как *in vitro*, так и *in vivo*.

Отметим также, что в литературе нет единого мнения о возможности расчета фармакодинамических параметров на основании всех трех фармакодинамических показателей (анти-Xa, анти-IIa активности и концентрация TFPI), определяемых для препаратов данной фармакологической группы. Ряд работ содержит данные по фармакодинамическим параметрам, полученные на основании анти-IIa-факторной активности после подкожного и внутривенного введения препарата Цертопарин (Новаритис, Германия) [1], подкожного введения препаратов далтепарина [4], эноксапарина [3, 6] наряду с данными для других показателей (анти-Xa, TFPI).

Вместе с тем авторы публикации [3] отмечают слабо выраженный эффект сравниваемых

¹⁵ ГОСТ Р 50779.42-99. Контрольные карты Шухарта. 2000.

¹⁶ Надропарин кальция. Инструкция по медицинскому применению. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=1fb59f3d-37f9-4922-a04c-680f0edbe405&t=
Фраксипарин форте. Инструкция по медицинскому применению. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=5922a504-bd7e-43ef-89dd-0fae986b5267&t=

¹⁷ Australian Public Assessment Report for Nadroparin. 2018. <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/auspar-nadroparin-180904.pdf>
Фраксипарин форте. Инструкция по медицинскому применению. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=5922a504-bd7e-43ef-89dd-0fae986b5267&t=

препаратов эноксапарина по отношению к анти-IIa активности, а авторы работы [6] подчеркивают наибольшее значение анти-Xa активности для оценки фармакологического действия и безопасности сравниваемых препаратов. Авторы [15] при сопоставлении фармакокинетики препаратов НМГ (дальтепарина натрия и надропарина кальция) у детей с онкологическими заболеваниями, осложненными тромбозом, а также авторы ряда других работ, связанных с оценкой фармакокинетики препаратов данной фармакологической группы (например, [16–20]), оперируют только параметрами, основанными на анти-Xa активности.

В работе [2] суммированы результаты исследований биоэквивалентности сразу нескольких препаратов группы НМГ – эноксапарина, далтепарина, тинзапарина и фондапаринокса (надропарина) при подкожном введении. Авторы рекомендуют использовать для оценки биоэквивалентности этих препаратов параметры, полученные на основе оценки анти-Xa активности, а результаты по анти-IIa активности считают необходимым представлять в качестве доказательства сопоставимого терапевтического воздействия. Эта позиция согласуется с полученными нами результатами. С нашей точки зрения, схожее отсутствие значимого отклика в отношении одного из показателей (анти-IIa активности) для обоих сравниваемых препаратов при соблюдении необходимых критериев эквивалентности по результатам оценки двух других показателей (анти-Xa активности и концентрации TFPI) является достаточными аргументами для подтверждения их эквивалентности.

Заключение

При сравнительном исследовании фармакодинамики и оценке эквивалентности биоаналогичного препарата «надропарин кальция»

при подкожном введении выявлен ряд особенностей, которые важны для планирования аналогичных исследований.

Отмечена необходимость дополнительного разделения (аликвотирования) каждого биообразца при их отборе с получением двух испытуемых аликвот (одна для определения анти-Xa и анти-IIa активностей, вторая – для анализа TFPI) для корректного выполнения их дальнейшего анализа. Показано, что валидация биоаналитических методик оценки анти-Xa активности, анти-IIa активности и содержания TFPI в плазме крови человека, валидированных в диапазоне концентраций 0,024–0,182 МЕ/мл, 0,0069–0,052 МЕ/мл и 1,56–100 нг/мл соответственно, в полном объеме для каждого нового действующего вещества нецелесообразна, достаточно проверки отсутствия мешающего влияния изучаемого препарата и его плацебо на аналитическую процедуру с одновременным подтверждением активности препарата *in vitro* (в отношении анти-Xa и анти-IIa активностей).

При планировании сравнительных исследований фармакодинамики и оценки эквивалентности препаратов надропарина кальция необходимо учитывать возможность отсутствия значимого изменения анти-IIa активности плазмы крови на введение препарата и получения данных, не позволяющих рассчитать фармакодинамические параметры и сопоставить доверительные интервалы для трех анализируемых фармакодинамических показателей.

Указанные особенности могут быть характерны и для других препаратов НМГ, поскольку при сравнительном исследовании фармакодинамики и оценке эквивалентности таких препаратов используют суррогатные маркеры концентрации, а не содержание исходного действующего вещества.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hoffmann U, Harenberg J, Bauer K, Huhle G, Tolle AR, Feuring M, Christ M. Bioequivalence of subcutaneous and intravenous body-weight-independent high-dose low-molecular-weight heparin Certoparin on anti-Xa, Heptest, and tissue factor pathway inhibitor activity in volunteer. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2002;13(4):289–96. <https://doi.org/10.1097/00001721-200206000-00003>
2. Feng L, Shen-Tu J, Liu J, Chen J, Wu L, Huang M. Bioequivalence of generic and branded subcutaneous enoxaparin: A single-dose, randomized-sequence, open-label, two-period crossover study in healthy Chinese male subjects. *Clin Ther*. 2009;31(7):1559–67. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2009.07.017>
3. Gadiko C, Thota S, Tippabotla SK. Pharmacokinetic parameters to be evaluated for selected low molecular weight heparins in bioequivalence studies. *Int J Pharm Sci Res*. 2012;3(11):4065–72. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3\(11\).4065-72](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3(11).4065-72)
4. Gadiko C, Tippabhotla SK, Thota S, Cheerla R, Betha MR, Vobalaboina V. Bioequivalence study of two subcutaneous formulations of dalteparin: randomized, single-dose, two-sequence, two-period, cross-over study in healthy volunteers. *J Drug Assess*. 2013;2(1):21–9. <https://doi.org/10.3109/21556660.2013.781504>
5. Boubaker H, Grissa MH, Sassi M, Chakroun T, Beltaief K, Hassine M, et al. Generic and branded

- enoxaparin bioequivalence: A clinical and experimental study. *J Bioequiv Availab.* 2015;7(5):225–8. <https://doi.org/10.4172/jbb.1000244>
6. Martinez González J, Monreal M, Ayani Alma-gia IA, Llaudo Garín J, Ochoa Diaz de Monasterioguren L, Gutierrez Adúriz I. Bioequivalence of a biosimilar enoxaparin sodium to Clexane® after single 100 mg subcutaneous dose: results of a randomized, double-blind, crossover study in healthy volunteers. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:575–82. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S162817>
 7. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed.* 2010;99(3):306–14. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.01.007>
 8. Воробьев АВ, Чабров АМ, Савченко АА, Макацария АД Патогенетические особенности применения антикоагулянтной терапии у онкологических больных. *Акушерство, гинекология и репродукция.* 2016;10(1):26–37. [Vorobiev AV, Chabrov AM, Savchenko AA, Makatsariya AD. Anti-thrombotic therapy in cancer patients. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduktsiya = Obstetrics, Gynecology and Reproduction.* 2016;10(1):26–37 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17749/2313-7347.2015.10.1.026-037>
 9. Бицадзе ВО, Макацария АД. Применение низкомолекулярных гепаринов в акушерской практике. *Российский медицинский журнал.* 2000;8(18):772. [Bitsadze VO, Makatsariya AD. The use of low molecular weight heparins in obstetric practice. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal.* 2000;8(18):772 (In Russ.)]
 10. Fan P, Gao Y, Zheng M, Xu T, Schoenhagen P, Jin Z. Recent progress and market analysis of anticoagulant drugs. *J Thorac Dis.* 2018;10(3):2011–25. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.03.95>
 11. Qiu M, Huang S, Luo C, Wu Z, Liang B, Huang H, et al. Pharmacological and clinical application of heparin progress: An essential drug for modern medicine. *Biomed Pharmacother.* 2021;139:111561. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111561>
 12. Стуров НВ. Клиническая фармакология НМГ: важнейшие аспекты. *Трудный пациент.* 2006;4(11):38–42. [Sturov NN. Clinical pharmacology of low molecular weight heparins: the most important aspects. *Trudny patient = Difficult Patient.* 2006;4(11):38–42 (In Russ.)]
 13. Низкомолекулярные гепарины: оригинальные препараты и их биоаналоги — выбор в клинической практике. Семинар. *Атеротромбоз.* 2017;(2):142–51. [Low molecular weight heparins: original drugs and their biosimilars — the choice in clinical practice. Seminar. *Aterotromboz = Atherothrombosis.* 2017;(2):142–51 (In Russ.)]
 14. Fareed J, Hoppensteadt D, Walenga J, Iqbal O, Ma Q, Jeske W, Sheikh T. Pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of enoxaparin: implications for clinical practice. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(12):1043–57. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342120-00003>
 15. Дмитриев ВВ, Липай НВ, Мигаль НВ, Бегун ИВ, Дмитриев ЕВ. Фармакокинетика низкомолекулярных гепаринов при тромбозах, осложнивших лечение детей с онкологическими заболеваниями. *Онкогематология.* 2021;16(1):73–82. [Dmitriev VV, Lipay NV, Migal NV, Begun IV, Dmitriev EV. Pharmacokinetics of low molecular weight heparins in thrombosis, complicate the treatment of children with cancer. *Onkogematologiya = Oncohematology.* 2021;16(1):73–82 (In Russ.)] <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2021-16-1-73-82>
 16. Rico S, Antonijoan RM, Ballester MR, Gutierrez I, Ayani I, Martinez-Gonzalez J, et al. Pharmacodynamics assessment of Bemiparin after multiple prophylactic and single therapeutic doses in adult and elderly healthy volunteers and in subjects with varying degrees of renal impairment. *Thromb Res.* 2014;133(6):1029–38. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.03.038>
 17. Egan G, Ensom MH. Measuring anti-factor Xa activity to monitor low-molecular-weight heparin in obesity: a critical review. *Can J Hosp Pharm.* 2015;68(1):33–47. <https://doi.org/10.4212/cjhp.v68i1.1423>
 18. Nutescu EA, Burnett A, Fanikos J, Spinler S, Witkowski A. Pharmacology of anticoagulants used in the treatment of venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis.* 2016;41(1):15–31. <https://doi.org/10.1007/s11239-015-1314-3>
 19. Pannucci CJ, Fleming KI, Bertolaccini CB, Prazak AM, Huang LC, Pickron TB. Assessment of anti-factor Xa levels of patients undergoing colorectal surgery given once-daily enoxaparin prophylaxis: a clinical study examining enoxaparin pharmacokinetics. *JAMA Surg.* 2019;154(8):697–704. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2019.1165>
 20. Cihlar R, Sramek V, Papiez A, Penka M, Suk P. Pharmacokinetic comparison of subcutaneous and intravenous nadroparin administration for thromboprophylaxis in critically ill patients on vasopressors. *Pharmacology.* 2020;105(1–2):73–8. <https://doi.org/10.1159/000502847>

Вклад авторов. В.М. Косман — идея исследования, обработка и систематизация экспериментальных данных, подготовка и доработка рукописи; Н.М. Фаустова — экспериментальная работа по валидации методик и анализу биопроб; М.В. Карлина — обсуждение и интерпретация результатов, доработка текста рукописи; И.Г. Котельникова — анализ данных литературы и нормативных документов, редактирование текста рукописи; Е.А. Ежова — анализ данных литературы; В.Г. Макаров — концепция исследования, М.Н. Макарова — критический пересмотр текста рукописи и иллюстративного материала.

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. М.Н. Макарова является членом редакционной коллегии журнала «Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. Vera M. Kosman — elaboration of the study idea, processing and systematisation of experimental data, preparation and finalisation of the manuscript; Natalia M. Faustova — experimental work on method validation and bioassays; Marina V. Karlina — discussion and interpretation of the results, finalisation of the text of the manuscript; Irina G. Kotelnikova — analysis of literature data and regulatory documents, editing of the text of the manuscript; Ekaterina A. Ezhova — analysis of literature data; Valery G. Makarov — elaboration of the study concept; Marina N. Makarova — critical revision of the text and illustrative material.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. Marina N. Makarova is a member of the Editorial Board of the *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*, the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Косман Вера Михайловна, канд. фарм. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>

kosman.v.m@doclinika.ru

Карлина Марина Валерьевна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>

karlina.m.v@doclinika.ru

Фаустова Наталья Михайловна, канд. хим. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>

faustova.n.m@doclinika.ru

Ежова Екатерина Александровна.

mez@endopharm.ru

Котельникова Ирина Геннадьевна, канд. фарм. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1584-8739>

mez@endopharm.ru

Макаров Валерий Геннадьевич, д-р мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>

makarov.v.g@doclinika.ru

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>

makarova.m.n@doclinika.ru

Статья поступила 16.11.2021

После доработки 28.01.2022

Принята к печати 07.06.2022

Online first 20.07.2022

Vera M. Kosman, Cand. Sci. (Pharm.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>

kosman.v.m@doclinika.ru

Marina V. Karlina, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>

karlina.m.v@doclinika.ru

Natalia M. Faustova, Cand. Sci. (Chem.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>

faustova.n.m@doclinika.ru

Ekaterina A. Ezhova.

mez@endopharm.ru

Irina G. Kotelnikova, Cand. Sci. (Pharm.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1584-8739>

mez@endopharm.ru

Valery G. Makarov, Dr. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>

makarov.v.g@doclinika.ru

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>

makarova.m.n@doclinika.ru

Article was received 16 November 2021

Revised 28 January 2022

Accepted for publication 7 June 2022

Online first 20 July 2022



Ю.С. Транова 
А.В. Шулькин 
И.В. Черных 
П.Ю. Мыльников 
А.А. Слепнев 
Е.Н. Якушева 

Количественный анализ митоксантрона методом ВЭЖХ-МС/МС в среде для культивирования клеток Сасо-2

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
ул. Высоковольтная, д. 9, Рязань, 390026, Российская Федерация

✉ Черных Иван Владимирович; ivchernykh88@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Митоксантрон — маркерный субстрат белка устойчивости рака молочной железы (BCRP), участвующего в ряде фармакокинетических межлекарственных взаимодействий. При проведении исследований *in vitro* в связи с возможной насыщенностью транспортера BCRP целесообразно применять невысокие концентрации митоксантрона, поэтому необходим высокочувствительный метод его количественного определения.

Цель работы: разработка и валидация методики количественного определения митоксантрона в среде для культивирования клеток Сасо-2 методом ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы: анализ выполняли на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» (Thermo Fisher Scientific) с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором TSQ Fortis и колонкой UCT Selectra C18 4,6×100 мм, 5 мкм, 100 Å. Использовали градиентный режим элюирования, подвижная фаза — смесь раствора муравьиной кислоты 1% и метанола. Скорость подвижной фазы — 0,3 мл/мин, температура разделения — 35 °С, объем пробы — 5 мкл. Длительность анализа — 10 мин, время удерживания митоксантрона — 5,51 мин. Пробоподготовка заключалась в осаждении белка среды для культивирования метанолом и центрифугировании (13000 g, 10 мин). Детектирование проводили в режиме регистрации положительных ионов, метод ионизации — электрораспыление (3700 В), облучающий газ 50 л/мин, вспомогательный газ 10 л/мин, продувочный газ 1 л/мин, температура трубки для переноса ионов 300 °С, температура испарителя 350 °С. Переходы масс: 455 m/z → 88,2 m/z при энергии столкновения 25 В, 455 m/z → 358,1 m/z при 18 В, фрагментация источника 0, CID газ 2 мТорр.

Результаты: методика характеризовалась селективностью (предел обнаружения — 10 нмоль/л, нижний предел количественного определения — 50 нмоль/л), правильностью, прецизионностью и линейностью (50–1000 нмоль/л). Отсутствовал перенос пробы и матричный эффект, образцы проб обладали стабильностью при моделировании реальных условий хранения. Методика позволяет проводить доклинические исследования влияния лекарственных веществ на активность BCRP путем оценки трансцеллюлярного переноса митоксантрона в присутствии тестируемого вещества.

Выводы: разработана и валидирована ВЭЖХ-МС/МС методика количественного анализа митоксантрона в среде для культивирования клеток Сасо-2.

Ключевые слова: митоксантрон; ВЭЖХ-МС/МС; маркерный субстрат BCRP; валидация; доклинические исследования

Для цитирования: Транова Ю.С., Шулькин А.В., Черных И.В., Мыльников П.Ю., Слепнев А.А., Якушева Е.Н. Количественный анализ митоксантрона методом ВЭЖХ-МС/МС в среде для культивирования клеток Сасо-2. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(1):104–111. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-449>

Yu.S. Tranova 
A.V. Shchulkin 
I.V. Chernykh 
P.Yu. Mylnikov 
A.A. Slepnev 
E.N. Yakusheva 

Mitoxantrone Quantification by HPLC-MS/MS in Caco-2 Culture Media

I.P. Pavlov Ryazan State Medical University,
9 Vysokovoltynaya St., Ryazan 390026, Russian Federation

✉ Ivan V. Chernykh; ivchernykh88@mail.ru

ABSTRACT

Mitoxantrone is a marker substrate of breast cancer resistance protein (BCRP). BCRP is involved in a number of pharmacokinetic drug–drug interactions. The transporter's possible saturability makes it advisable to use low concentrations of mitoxantrone for *in vitro* studies. Consequently, mitoxantrone quantification requires a method with high sensitivity.

The aim of the study was to develop and validate a procedure for mitoxantrone quantification in Caco-2 culture media by HPLC-MS/MS.

Materials and methods. The authors used an Ultimate 3000 HPLC system and a TSQ Fortis triple quadrupole mass spectrometer by Thermo Fisher Scientific and a Selectra C18 column (4.6×100 mm, 5 µm, 100 Å) by United Chemical Technologies. The elution ran in a gradient mode with a mobile phase of 1% formic acid solution and methanol. Experimental parameters were as follows: eluent flow rate, 0.3 mL/min; separation column temperature, 35 °C; injection volume, 5 µL; analysis time, 10 min; approximate mitoxantrone retention time, 5.51 min. The sample preparation involved protein precipitation from the culture medium with methanol, followed by centrifugation at 13,000 g for 10 min. The detection was performed using electrospray ionisation in the positive ion mode. Detection parameters were as follows: electrospray voltage, 3700 V; sheath gas flow rate, 50 L/min; auxiliary gas flow rate, 10 L/min; sweep gas flow rate, 1 L/min; ion-transfer tube temperature, 300 °C; and evaporator temperature, 350 °C. The detection was set at mass transitions of m/z 455 to 88.2 and m/z 455 to 358.1, with the collision energy for these transitions amounting to 25 V and 18 V, respectively. The source fragmentation was at 0, and the CID gas pressure was at 2 mTorr.

Results. The analytical procedure showed selectivity, high sensitivity (limit of detection, 10 nmol/L; lower limit of quantification, 50 nmol/L), accuracy, precision, and linearity in the concentration range of 50–1000 nmol/L. The authors observed no carry-over or matrix effects. A simulation of real-life storage conditions demonstrated high stability of mitoxantrone samples. Thus, the analytical procedure enables preclinical evaluation of medicinal product effects on the functional activity of BCRP, based on assessing the transcellular mitoxantrone transport in the presence of a test product.

Conclusion. The authors developed and validated the analytical procedure for mitoxantrone quantification in Caco-2 culture media by HPLC-MS/MS.

Key words: mitoxantrone; HPLC-MS/MS; BCRP marker substrate; validation; preclinical studies

For citation: Tranova Yu.S., Shchulkin A.V., Chernykh I.V., Mylnikov P.Yu., Slepnev A.A., Yakusheva E.N. Mitoxantrone quantification by HPLC-MS/MS in Caco-2 culture media. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):104–111. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-449>

Введение

Митоксантрон — синтетическое противоопухолевое средство, производное антрацендиона, применяемое для терапии рака молочной железы и простаты, лимфомы и лейкемии. Основной механизм действия препарата заключается в ингибировании фермента топоизомеразы II, необходимого для процесса репарации ДНК [1].

Одним из новых методов доклинического исследования лекарственных средств является изучение их взаимодействий на уровне мембранных белков-транспортеров *in vitro*. В соответствии с руководствами зарубежных регуляторных органов¹ и отечественными рекомендациями² все новые лекарственные вещества необходимо тестировать на принадлежность к субстратам и модуляторам активности белков-транспортеров.

¹ *In vitro* metabolism and transporter-mediated drug–drug interaction studies. Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2017.

² Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2014.

Митоксантрон является субстратом эффлюксного мембранного белка устойчивости рака молочной железы (breast cancer resistance protein, BCRP), который препятствует всасыванию препарата в кишечнике и проникновению в опухолевые клетки, а также способствует экскреции препарата гепатобилиарной системой. BCRP — продукт экспрессии гена *ABCG2*, эффлюксный АТФ-зависимый белок-транспортер, впервые обнаруженный в 1998 г. в клетках рака молочной железы (линия MCF-7/AdrVp), которые не содержали гликопротеина-P (ABCB1-белок) и транспортера MRP1, но проявляли множественную лекарственную устойчивость [2]. Транспортер экспрессируется также в синцитиотрофобластах плаценты человека и в меньшей степени на апикальной мембране эпителия тонкой кишки, на капиллярной поверхности гепатоцитов, в эндотелиоцитах гематоэнцефалического барьера, в стволовых клетках, в яичниках, надпочечниках и легких [3]. Такая локализация белка в тканях, а также принадлежность к числу его субстратов широкого спектра лекарственных веществ (противоопухолевые агенты, производные нуклеозидов и нуклеотидов, препараты стероидных гормонов, ряд антибиотиков и пр. [4]) свидетельствует о его активном влиянии на фармакокинетику лекарственных средств [5]. Вариабельность активности BCRP, продемонстрированная в многочисленных исследованиях, повышает вероятность возникновения межлекарственных фармакокинетических взаимодействий с его участием.

Митоксантрон является маркерным субстратом BCRP, т.е. препаратом, фармакокинетика которого существенно зависит от функционирования транспортера. Таким образом, интенсивность переноса вещества через клеточный монослой может служить показателем активности BCRP. Определение активности белков-транспортеров путем оценки трансцеллюлярного переноса их маркерных субстратов или анализа их фармакокинетики было одобрено, например, для оценки влияния лекарственных средств на ABCB1-белок соответственно *in vitro* и *in vivo*³ [6, 7]. В связи с тем что опыты *in vitro* требуют меньших временных и экономических затрат, а также не сопряжены с этическими проблемами, они являются предпочтительными для исследования влияния биологически активных веществ на активность транспортных белков.

Оценка интенсивности переноса митоксантрона через билипидную мембрану клеток, гиперэкспрессирующих BCRP, например, доступной в России линии клеток Caco-2 [5], позволит

не только определять принадлежность тестируемых веществ к его субстратам или модуляторам и прогнозировать нежелательные межлекарственные взаимодействия, но также проводить направленный поиск веществ-ингибиторов данного транспортера с целью их дальнейшего использования для повышения эффективности химиотерапии рака молочной железы.

В опытах *in vitro* целесообразно применять невысокие концентрации митоксантрона, что связано с возможной насыщаемостью транспортера BCRP. Поэтому необходим высокочувствительный метод количественного определения митоксантрона. Широко распространенным методом анализа лекарственных веществ в биологических жидкостях является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) детектированием. Однако этот метод имеет ряд существенных недостатков: относительно низкую разрешающую способность и специфичность, длительность анализа, необходимость использования сложной и дорогостоящей экстракции для пробоподготовки [8]. Ранее с использованием более чувствительного и селективного метода — ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) была разработана методика количественного анализа метотрексата — еще одного субстрата BCRP — в среде для культивирования клеток Caco-2 [9]. Митоксантрон имеет важное преимущество: отношение коэффициентов кажущейся проницаемости данного вещества в трансвелл-системе ($6,18 \pm 0,17$) — параметр, характеризующий степень участия белка-транспортера в его трансцеллюлярном переносе — превышает отношение тех же коэффициентов метотрексата ($3,38 \pm 0,08$). Это делает митоксантрон более предпочтительным для использования в качестве маркера функционирования BCRP.

Цель работы — разработать и валидировать методику количественного анализа митоксантрона (маркерного субстрата BCRP) в среде для культивирования клеток Caco-2 методом ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы

В качестве стандартного образца использовали субстанцию митоксантрона (Sigma Aldrich, кат. № MKCM8540). Матричный раствор митоксантрона в метаноле с концентрацией 1 мг/мл ($2,27 \times 10^6$ нмоль/л) хранили при температуре -20°C . Рабочие растворы (с концентрациями 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 и 10000 нмоль/л) готовили из матричного раствора путем

³ Clinical drug interaction studies — Cytochrome P450 enzyme- and transporter-mediated drug interactions. Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2020.

его разбавления в среде для культивирования, представляющей собой раствор Хэнкса (ООО «ПанЭко», кат. № P020п) с 25 мМ HEPES (Gibco, кат. № 2026999) и 1% диметилсульфоксида (ООО «ПанЭко», кат. № Ф135). Калибровочные растворы (с концентрациями 50, 100, 200, 400, 600, 800 и 1000 нмоль/л митоксантрона) и образцы для контроля качества (с концентрациями 50, 150, 400 и 800 нмоль/л митоксантрона) готовили разведением равных объемов рабочих растворов средой для культивирования, получаемой после инкубации с клетками линии Сасо-2 в течение 3 ч (клетки могут выделять в среду ряд высокомолекулярных соединений, способных повлиять на результаты анализа). Готовили три серии калибровочных растворов и растворов контроля качества, одна серия составляла один валидационный цикл. Аналитический диапазон выбирали на основе концентраций, ожидаемых в исследовании на указанной клеточной линии.

Количественный анализ выполняли на высокоэффективном жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Thermo Fisher), оснащенном автосемплером, дегазатором, градиентным насосом и тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором TSQ Fortis (Thermo Fisher).

Управление системой и математическую обработку данных проводили с помощью программы Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47).

Использовали обращенно-фазовую хроматографическую колонку UCT Selectra C18 4,6×100 мм, 5 мкм, 100 Å (United Chemical Technologies) и предколонку Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM (United Chemical Technologies).

Использовали градиентный режим элюирования смесью раствора муравьиной кислоты и метанола (табл. 1). Скорость подвижной фазы составляла 0,3 мл/мин при температуре 35 °С, объем вводимой пробы – 5 мкл.

Время одного анализа составляло 10 мин, время удерживания митоксантрона соответствовало 5,51±0,013 мин. Для приготовления подвижной фазы применяли следующие реактивы: вода для ВЭЖХ-МС (VWR, кат. № 21F104014), кислота муравьиная 98% (Panreac, кат. № 0001900259), метанол квалификации «ос.ч.» для градиентной ВЭЖХ (ООО ТД «Химмед»).

Анализ проводили в режиме регистрации положительных ионов, метод ионизации – электрораспыление, напряжение на игле распылителя 3700 В; скорость потока оболочечного газа (sheath gas) составляла 50 л/мин, вспомогательного газа (auxiliary gas) – 10 л/мин, продувочного газа (sweep gas) – 1 л/мин, температура трубки для переноса ионов – 300 °С, температура испарителя – 350 °С. Для детектирования митоксантрона использовали следующие переходы масс: 455 m/z → 88,2 m/z при энергии столкновения 25 В и 455 m/z → 358,1 m/z при энергии столкновения 18 В, фрагментация источника 0, CID gas 2 мТорр.

Пробоподготовка заключалась в осаждении белка и других высокомолекулярных веществ (которые могут присутствовать в среде для культивирования после инкубации с клетками) метанолом. Для этого к 100 мкл пробы добавляли 400 мкл метанола, перемешивали на встряхивателе Vortex (Heidolph), центрифугировали на центрифуге Avanti JXN-3 (Beckman Coulter) при 13000 g в течение 10 мин.

Для расчета метрологических характеристик и основных валидационных параметров разработанной методики применяли программы Statistica 13.0 и Microsoft Excel.

Биоаналитическую методику валидировали по следующим параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения, правильность (на уровнях внутри цикла, между циклами), прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами), матричный эффект, перенос пробы и стабильность образцов в соответствии с действующими отечественными и зарубежными руководствами⁴.

Таблица 1. Программа градиентного элюирования для анализа митоксантрона

Table 1. Gradient elution programme for mitoxantrone analysis

Время анализа, мин <i>Time, min</i>	Соотношение компонентов подвижной фазы по объему, %: <i>Volume ratio of mobile phase components, %:</i>	
	раствор муравьиной кислоты 1 % <i>1% formic acid solution</i>	метанол <i>methanol</i>
0	70	30
0,3	10	90
6	70	30

⁴ Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2014.
Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».
Bioanalytical method validation. Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2018.
Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London; 2011.

Результаты и обсуждение

Основным аналитическим методом, используемым при изучении фармакокинетики лекарственных веществ для оценки их концентрации в биожидкостях, является ВЭЖХ. При этом универсальным и наиболее селективным методом детектирования стала tandemная масс-спектрометрия (МС/МС) [10]. Для митоксантрона ранее предложена методика количественного анализа данным методом с УФ-детектированием [11], что снижает ее специфичность, а также требует значительного увеличения объема вводимого образца. Использование флуоресцентного детектора для митоксантрона затруднительно в связи с его низкой флуоресцирующей способностью [12].

Селективность разработанной нами методики определяли, анализируя холостую пробу среды для культивирования без добавления стандарта митоксантрона и образца среды для культивирования с добавлением митоксантрона до конечных концентраций 50, 150, 400 и 800 нмоль/л. На хроматограммах образцов холостой среды для культивирования не наблюдали пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания целевого вещества (рис. 1).

Предел обнаружения митоксантрона в среде для культивирования составил 10 нмоль/л, при этом соотношение сигнала к шуму (базовой

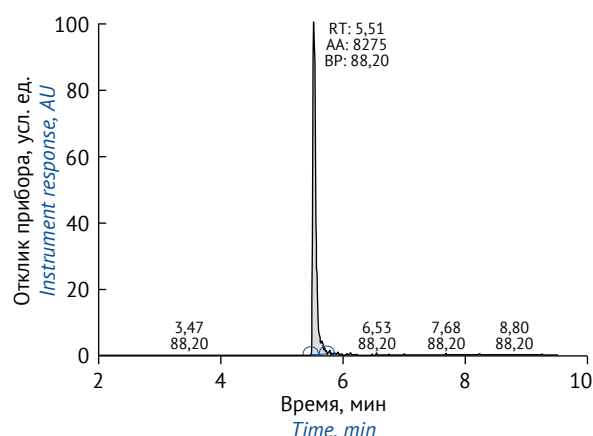


Рис. 1. Хроматограмма среды для культивирования с добавлением 1000 нмоль/л митоксантрона (RT – retention time, время удерживания; AA – automatic area, площадь пика; BP – base peak, молекулярная масса основного продукта распада молекулярного иона)

Fig. 1. Chromatogram of the culture medium with 1000 nmol/L mitoxantrone (RT, retention time; AA, automatic area measurement; BP, base peak representing the molecular weight of the main product of molecular ion decay)

линии) превышало 3. Нижний предел количественного определения митоксантрона составил 50 нмоль/л. При этом отношение сигнала к шуму было не ниже 10, а правильность и прецизионность определения не превышали 20%.

Калибровочную кривую строили, анализируя 7 калибровочных растворов (образцов холостой среды для культивирования с добавлением растворов митоксантрона до получения концентраций 50, 100, 200, 400, 600, 800 и 1000 нмоль/л). Полученные калибровочные графики зависимости площади пика от концентрации вещества (образец одного из графиков приведен на рисунке 2) могут быть экстраполированы следующими уравнениями линейной регрессии: $y = -133,844 + 8,395 \times x$, коэффициент корреляции $r = 0,9986$; $y = -217,449 + 9,438 \times x$, $r = 0,9987$, $W = 1/x$; $y = -289,597 + 9,62134 \times x$, $r = 0,9989$, $W = 1/x$. Полученные коэффициенты корреляции соответствовали рекомендованным значениям (не менее 0,99)⁵.

Отклонения найденных концентраций калибровочных образцов от номинальных значений, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, приведены в таблице 2 и демонстрируют близость каждой точки к калибровочной кривой. Экспериментально рассчитанные концентрации калибровочных растворов должны лежать в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений (за исключением концентрации, соответствующей нижнему пределу количественного определения, для которой эти значения могут находиться в пределах $\pm 20\%$)⁶.

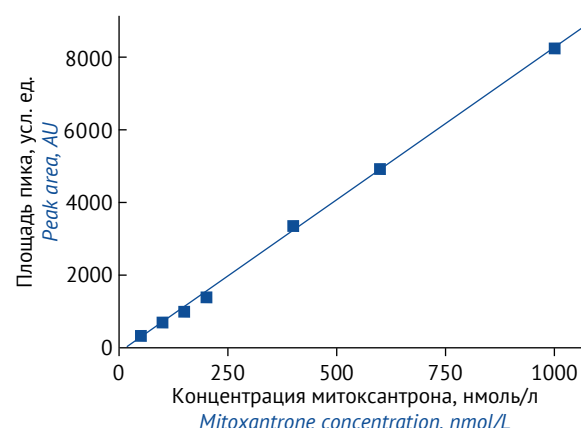


Рис. 2. Образец калибровочного графика зависимости «концентрация митоксантрона – площадь пика»

Fig. 2. Exemplar calibration curve of mitoxantrone concentration versus peak area

⁵ Bioanalytical method validation. Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2018.

⁶ Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2014.
Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

Правильность и прецизионность методики оценивали, выполняя анализ образцов для контроля качества митоксантрона с концентрациями 50, 150, 400 и 800 нмоль/л в рамках трех циклов, параметры оценивали внутри и между циклами. Полученные величины прецизионности

(относительного стандартного отклонения) и правильности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек) (табл. 3 и 4).

Таблица 2. Отклонения вычисленных концентраций митоксантрона в калибровочных растворах от номинальных значений

Table 2. Deviations of mitoxantrone concentrations in calibration samples from their nominal values

Концентрация митоксантрона номинальная, нмоль/л <i>Nominal mitoxantrone concentration, nmol/L</i>	Серия калибровочных растворов 1 <i>Set of calibration solutions 1</i>		Серия калибровочных растворов 2 <i>Set of calibration solutions 2</i>		Серия калибровочных растворов 3 <i>Set of calibration solutions 3</i>	
	Концентрация рассчитанная, нмоль/л <i>Calculated concentration, nmol/L</i>	Правильность, % <i>Accuracy, %</i>	Концентрация рассчитанная, нмоль/л <i>Calculated concentration, nmol/L</i>	Правильность, % <i>Accuracy, %</i>	Концентрация рассчитанная, нмоль/л <i>Calculated concentration, nmol/L</i>	Правильность, % <i>Accuracy, %</i>
50,0	56,23	12,47	44,20	11,61	50,86	1,71
100,0	99,38	0,62	90,74	9,26	96,52	3,49
200,0	182,99	8,50	204,60	2,30	208,21	4,10
400,0	415,99	4,00	418,81	4,70	418,35	4,59
600,0	606,65	1,11	618,63	3,11	614,36	2,39
800,0	697,56	12,88	819,24	2,40	811,15	1,39
1000,0	1001,67	0,17	967,64	3,24	956,74	4,32

Таблица 3. Правильность и прецизионность методики количественного определения митоксантрона в среде для культивирования клеток Сасо-2 внутри цикла и между циклами

Table 3. Intra- and inter-run accuracy and precision of the analytical procedure for mitoxantrone quantification in Caco-2 culture media

Уровень концентрации митоксантрона, нмоль/л <i>Mitoxantrone concentration, nmol/L</i>	Параметр <i>Parameter</i>	Результаты определения концентрации митоксантрона (диапазон / среднее арифметическое) <i>Mitoxantrone concentration measurement results (range / arithmetic mean)</i>
50 150 400 800	Правильность, % <i>Accuracy, %</i>	13,19–18,22 / 14,92 3,95–4,96 / 4,42 7,74–10,87 / 8,83 4,14–5,89 / 4,76
50 150 400 800	Прецизионность, % <i>Precision, %</i>	11,72–16,13 / 13,76 3,18–6,10 / 5,72 6,93–9,32 / 8,34 5,42–6,88 / 5,98

Таблица 4. Правильность при определении стабильности растворов митоксантрона с концентрациями 150 и 800 нмоль/л

Table 4. Accuracy observed in the stability study of 150 nmol/L and 800 nmol/L mitoxantrone solutions

Условия хранения <i>Storage conditions</i>	Концентрация номинальная, нмоль/л <i>Nominal concentration, nmol/L</i>	Концентрация рассчитанная средняя, нмоль/л <i>Calculated average concentration, nmol/L</i>	Правильность, % <i>Accuracy, %</i>
При комнатной температуре <i>Room temperature</i>	150,00	143,44	4,37
	800,00	793,87	0,77
Трехкратная заморозка-разморозка при –80 °С <i>Three freeze-thaw cycles at –80 °C</i>	150,00	148,11	1,26
	800,00	786,24	1,72
Хранение при –80 °С в течение 60 сут <i>Storage at –80 °C for 60 days</i>	150,00	137,40	8,40
	800,00	764,32	4,46
После пробоподготовки и нахождения в автосемплере в течение 24 ч <i>Sample preparation and 24 h in the autosampler</i>	150,00	156,07	4,04
	800,00	776,60	2,92

Матричный эффект оценивали по площади пиков митоксантрона с концентрациями 50 и 800 нмоль/л в растворах со средой для культивирования и в метаноле. Относительное стандартное отклонение эффекта матрицы, отобранной из 6 отдельных лунок планшета, не превышало 15%.

Стабильность растворов митоксантрона с концентрациями 150 и 800 нмоль/л в среде для культивирования анализировали при краткосрочном хранении в условиях комнатной температуры, трехкратной заморозке-разморозке при -80°C , при хранении при -80°C в течение 60 сут, после пробоподготовки и нахождения в автосемплере в течение 24 ч. Выполняли по 3 повтора для каждого вида стабильности. Правильность для каждой концентрации (для средних значений) находилась в пределах 15% от номинальных значений (табл. 4).

При последовательном анализе пробы с концентрацией митоксантрона 1000 нмоль/л и холостой пробы (образец среды для культивирования) на хроматограмме последней отсутствовали пики, соответствующие по времени

удерживания пикам митоксантрона, т.е. переноса проб не происходило.

Заключение

Разработанная ВЭЖХ-МС/МС методика количественного определения митоксантрона (маркерного субстрата BCRP) в среде для культивирования клеток Caco-2 обладает более высокой специфичностью и разрешающей способностью, позволяет проводить более быструю пробоподготовку и количественный анализ проб по сравнению с ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Данная методика валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения, правильность, прецизионность, матричный эффект, перенос пробы и стабильность. Полученный аналитический диапазон позволяет использовать методику для определения концентрации митоксантрона при оценке его транспорта через монослой клеток линии Caco-2 с целью анализа тест-веществ на принадлежность к модуляторам активности белка-транспортера BCRP.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Martinelli Boneschi F, Vacchi L, Rovaris M, Capra R, Comi G. Mitoxantrone for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;31(5):CD002127. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002127.pub3>
2. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(26):15665–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15665>
3. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*. 2001;61(8):3458–64. PMID: 11309308
4. Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport – an update. *AAPS J*. 2015;17(1):65–82. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9668-6>
5. Kawahara I, Nishikawa S, Yamamoto A, Kono Y, Fujita T. The impact of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) on drug transport across Caco-2 cell monolayers. *Drug Metab Dispos*. 2020;48(6):491–8. <https://doi.org/10.1124/dmd.119.088674>
6. Ерохина, ПД, Абаленихина ЮВ, Шулькин АВ, Черных ИВ, Попова НМ, Сlepnev AA, Якушева ЕН. Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-Р in vitro. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2020;28(2):135–42.
7. Ерохина, ПД, Абаленихина ЮВ, Шулькин АВ, Черных ИВ, Котлярова АА, Правкин СК и др. Влияние эстрадиола на активность гликопротеина-Р in vitro. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2020;8(3):329–36.
8. Ерохина ПД, Абаленихина ЮВ, Шулькин АВ, Черных ИВ, Котлярова АА, Правкин СК, et al. Study of influence of estradiol on the activity of P-glycoprotein in vitro. *Science of the Young (Eruditio Juvenium)*. 2020;8(3):329–36 (In Russ.). <https://doi.org/10.23888/HMJ202083329-336>
9. Zhang P, Ling G, Sun J, Sun Y, Pu X, Wang Z, He Z. Determination of mitoxantrone in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: Application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010;878(24):2260–5. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.06.016>
10. Мыльников ПЮ, Транова ЮС, Шулькин АВ, Якушева ЕН. Разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(1):45–51.
11. Mylnikov PYu, Tranova YuS, Shchulkin AV, Yakusheva EN. Development and validation of the method for the quantitative determination of methotrexate in

- a transport medium by HPLC-MS/MS. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2021;(1):45–51 (In Russ.).
<https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-45-51>
10. Hsieh Y. HPLC-MS/MS in drug metabolism and pharmacokinetic screening. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008;4(1):93–101.
<https://doi.org/10.1517/17425255.4.1.93>
11. Tietze R, Schreiber E, Lyrer S, Alexiou C. Mitoxantrone loaded superparamagnetic nanoparticles for drug targeting: a versatile and sensitive method for quantification of drug enrichment in rabbit tissues using HPLC-UV. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:597304.
<https://doi.org/10.1155/2010/597304>
12. Gameiro M, Silva R, Rocha-Pereira C, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML, Remião F. Cellular models and in vitro assays for the screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP. *Molecules*. 2017;22(4):600.
<https://doi.org/10.3390/molecules22040600>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Ю.С. Транова — выполнение хроматографических исследований, пробоподготовка; А.В. Шулькин — статистическая обработка полученных результатов, написание текста рукописи; И.В. Черных — выполнение хроматографических исследований, расчет валидационных параметров; П.Ю. Мыльников, А.А. Слепнев — выполнение хроматографических исследований; Е.Н. Якушева — написание и редактирование текста рукописи, общее руководство работой.

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Е.Н. Якушева является членом редколлегии журнала «Вестник НЦЭСМП. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Yuliya S. Tranova carried out chromatographic analyses and sample preparation. Alexey V. Shchulkin performed statistical analysis of the obtained results and drafted the manuscript. Ivan V. Chernykh carried out chromatographic analyses and calculated validation parameters. Pavel Yu. Mylnikov, Aleksandr A. Slepnev carried out chromatographic analyses. Elena N. Yakusheva drafted and edited the manuscript and coordinated the study.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. Elena N. Yakusheva is a member of the Editorial Board of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*; the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Транова Юлия Сергеевна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5068-1201>
yulyatran@gmail.com

Шулькин Алексей Владимирович, д-р мед. наук, доцент.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>
alekseyshulkin@rambler.ru

Черных Иван Владимирович, канд. биол. наук, доцент.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>
ivchernykh88@mail.ru

Мыльников Павел Юрьевич.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>
dukeviperlr@gmail.com

Слепнев Александр Александрович, канд. биол. наук, доцент.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0696-6554>
a.slepnev@rzgmu.ru

Якушева Елена Николаевна, д-р мед. наук, профессор.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>
e.yakusheva@rzgmu.ru

Yuliya S. Tranova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5068-1201>
yulyatran@gmail.com

Aleksey V. Shchulkin, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>
alekseyshulkin@rambler.ru

Ivan V. Chernykh, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>
ivchernykh88@mail.ru

Pavel Yu. Mylnikov.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>
dukeviperlr@gmail.com

Aleksandr A. Slepnev, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0696-6554>
a.slepnev@rzgmu.ru

Elena N. Yakusheva, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>
e.yakusheva@rzgmu.ru

Статья поступила 18.04.2022

После доработки 23.09.2022

Принята к печати 21.11.2022

Online first 31.01.2023

Received 18 April 2022

Revised 23 September 2022

Accepted 21 November 2022

Online first 31 January 2023



А.М. Агафонов¹ 
И.П. Ремезова² 
В.В. Косенко³ 
Н.Д. Бунятян^{3,4} 
Л.С. Аносова¹ 
В.А. Евтеев³ 

Определение степени ненасыщенности эфирных масел

¹ Государственная образовательная организация
высшего профессионального образования
«Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького»,
пр. Ильича, д. 16, Донецк, 283003, Российская Федерация

² Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Волгоградский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
пр. Калинина, д. 11, Пятигорск, 357500, Российская Федерация

³ 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

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет),
ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Агафонов Алексей Михайлович; chuh2008@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Широкое применение лекарственных препаратов на основе растительных масел требует строгой регламентации и оценки показателей качества, установления срока годности и контроля условий хранения. Наиболее часто для определения ненасыщенных соединений, входящих в состав растительных масел, используется метод определения йодного числа, однако он имеет ряд недостатков. Альтернативой ему является способ определения ненасыщенности, основанный на реакции эпексидирования.

Цель работы: оценка возможности определения степени ненасыщенности терпеноидов и эфирных масел с использованием пероксикарбоновых кислот.

Материалы и методы: в исследовании использовали линалоол, мирцен, лимонное масло, эпексидирование проводили пероксидекановой и пероксиоктановой кислотами. Избыток кислоты определяли йодометрическим титрованием.

Результаты: показана возможность количественного определения ненасыщенности отдельных терпеноидов и эфирного масла путем проведения эпексидирования пероксикислотами. Разработана методика определения йодного числа эфирного масла. Рассчитаны йодные числа для линалоола, мирцена и лимонного масла. Определено, что эпексидирование протекает как реакция второго порядка, рассчитаны константы скорости реакции (для линалоола — $3,9 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ (298 К), мирцена (до монооксида) — $1,76 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ (298 К), эпексида мирцена (до диэпексида) — $0,044 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ (298 К), лимонного масла — $3,9 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ (297 К)).

Выводы: предложена методика быстрого и эффективного определения степени ненасыщенности (определения йодного числа), основанная на титриметрии с использованием пероксикислот, которая может быть принята за основу метода количественного определения суммы ненасыщенных биологически активных веществ в эфирных маслах.

Ключевые слова: терпеноиды; эпексидирование; пероксикислота; линалоол; мирцен; лимонное масло; определение ненасыщенности; титрование; йодное число; эфирные масла

Для цитирования: Агафонов А.М., Ремезова И.П., Косенко В.В., Бунятян Н.Д., Аносова Л.С., Евтеев В.А. Определение степени ненасыщенности эфирных масел. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(1):112–120. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-492>

A.M. Agafonov¹ 
I.P. Remezova² 
V.V. Kosenko³ 
N.D. Bunyatyan^{3,4} 
L.S. Anosova¹ 
V.A. Evteev³ 

Determination of the Degree of Unsaturation in Essential Oils

¹ M. Gorky Donetsk National Medical University,
16 Ilyich Ave, Donetsk 283003, Russian Federation

² Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute,
branch of the Volgograd State Medical University,
11 Kalinin Ave, Pyatigorsk 357500, Russian Federation

³ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

✉ Alexey M. Agafonov; chuh2008@yandex.ru

ABSTRACT

Being widely used, medicinal products based on vegetable oils require strict regulation and evaluation of quality attributes, determination of shelf-life periods, and monitoring of storage conditions. The most common testing method for unsaturated compounds in vegetable oils is the iodine value determination, which has a range of limitations. An alternative method for determining the degree of unsaturation is based on epoxidation.

The aim of the study was to evaluate the possibility of determining the degree of unsaturation of terpenoids and essential oils using peroxycarboxylic acids.

Materials and methods. The authors performed epoxidation of linalool, myrcene, and lemon oil with peroxydecanoic and peroxyoctanoic acids, followed by iodometric titration of the excess acid.

Results. The study demonstrated the possibility of measuring the degree of unsaturation of the selected essential oil and terpenoids using peracid epoxidation. The authors developed a procedure for determining the iodine value of essential oils and calculated the iodine values of linalool, myrcene, and lemon oil. Epoxidation proceeded as a second-order reaction. The authors obtained the following reaction rate constants: $3.9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ for linalool (298 K), $1.76 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ for myrcene converting to monoxide (298 K), $0.044 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ for myrcene epoxide converting to diepoxide (298 K), and $3.9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ for lemon oil (297 K).

Conclusions. The suggested procedure involving peracid titration for rapid and efficient determination of the degree of unsaturation (iodine value) provides a potential basis for developing a quantification method for total unsaturated bioactive compounds in essential oils.

Key words: terpenoids; epoxidation; peroxy acid; linalool; myrcene; lemon oil; unsaturation test; titrimetry; iodine value; essential oils

For citation: Agafonov A.M., Remezova I.P., Kosenko V.V., Bunyatyan N.D., Anosova L.S., Evteev V.A. Determination of the degree of unsaturation in essential oils. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):112–120. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-492>

Введение

Эфирные масла, а также некоторые другие соединения, содержащие в структуре молекул ненасыщенные связи, нашли широкое применение в фармации в качестве активных действующих веществ лекарственных препаратов, а также вспомогательных веществ при создании мягких лекарственных форм [1–4]. Широкое применение лекарственных средств на основе растительных масел в терапии различных заболеваний, специфичность состава и свойств требуют строгой регламентации и оценки показателей их качества, установления срока годности и контроля за условиями хранения.

Наиболее часто используемым методом определения степени ненасыщенности, основанным на реакции присоединения, является метод определения йодного числа (I) — количества йода (г), который присоединяется в определенных условиях к 100 г органического вещества¹. Йодное число — показатель оценки качества жирных масел, позволяющий судить об их способности к окислению и полимеризации. Общий недостаток определения ненасыщенности по этому показателю заключается в том, что, помимо присоединения по двойным связям йод способен вступать в реакции галогенирования насыщенных атомов углерода в цепи молекулы. Кроме того, вещества изопреновой структуры, которые входят в состав эфирных масел, дополнительно могут подвергаться окислению (например, альдегидные группировки). Все вышесказанное может приводить к завышению результатов анализа. Таким образом, данный метод имеет ограниченное применение и, в частности, не может быть использован для характеристики степени ненасыщенности эфирных масел. Альтернативой ему является способ определения ненасыщенности, основанный на реакции эпексидирования, который не имеет таких недостатков.

Идентификацию эфирных масел проводят методом газовой хроматографии, в качестве значения показателя используют относительное значение времени удерживания отдельных компонентов либо проводят сравнение хроматографических профилей образца с эталонной хроматограммой. Также допускается определение подлинности масел методом тонкослойной хроматографии, хроматомасс-спектро스코пии или другими инструментальными методами (УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии и др.) [5].

При контроле качества эфирных масел кроме необходимых физико-химических показателей² [6] дополнительно может быть определено йодное число, что позволяет не только подтвердить сделанную по результатам фармакопейных методик оценку качества масла, исключить его фальсификацию или порчу во время хранения, но и осуществить количественное определение основного (одного или нескольких) компонента продукта или индивидуального натурального душистого вещества, полученного из эфирного масла [7]. Следует отметить, что в настоящее время не существует фармакопейных методов количественного определения ряда эфирных масел [8].

Метод оценки ненасыщенности путем определения кислородных чисел (масса кислорода (г), поглощенного 100 г пробы, КЧ) титрованием пероксикислотой на примере надбензойной кислоты предложил Н. Meerwein в 1924 г. [9]. Расчет КЧ осуществляли на основании данных йодометрического титрования, выраженных абсолютным снижением содержания «активного кислорода» в 1,00 мл раствора. Полученные результаты пересчитывали на йод и сравнивали с йодными числами, определенными по Вийсу [7, 10].

В работе [7] показана возможность использования метода эпексидирования с использованием относительно стабильной высшей пероксикарбоновой кислоты — пероксиоктановой — для определения степени ненасыщенности некоторых терпеноидов и эфирных масел, применяющихся в медицине [11].

Важным фактором, определяющим возможность использования методики для анализа, является устойчивость выбранных реагентов. В работе [10] показано, что в условиях длительных анализов (несколько часов) при комнатной температуре достаточно устойчивыми являются 0,3–0,5% растворы пероксикислоты (перокси-декановой и пероксиоктановой) в хлороформе или дихлорметане. Именно в этих растворителях достигается наивысшая скорость окисления при одновременном обеспечении количественной стехиометрии реакции эпексидирования ненасыщенных связей [12].

Цель работы — оценка возможности определения степени ненасыщенности терпеноидов и эфирных масел с использованием пероксикарбоновых кислот.

¹ ОФС.1.2.3.0005.15. Йодное число. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

² ОФС.1.5.2.0001.15. Эфирные масла. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

Материалы и методы

В работе использовали линалоол (3,7-диметил-1,6-октадиен-3-ол) с содержанием основного действующего вещества $\geq 95,0\%$, плотность $0,858\text{--}0,868\text{ г/см}^3$, Sigma-Aldrich, кат. № 504505; мирцен (7-метил-3-метилен-1,6-октадиен) с содержанием основного действующего вещества $\geq 90,0\%$, плотность $0,794\text{ г/см}^3$, Sigma-Aldrich, кат. № 276212; лимонное масло — плотность $0,895\text{--}0,91\text{ г/см}^3$, ООО «Парфумерно-косметична компания „ДНД“», сер. 0815.

Пероксидекановая (пероксикаприновая) кислота, $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_8\text{CO}_2\text{H}$, (8,5% активного кислорода) и пероксиоктановая (пероксикаприловая) кислота, $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_6\text{CO}_2\text{H}$, (9,98% активного кислорода) были получены по методике [13] взаимодействием декановой или октановой кислот с 50% пероксидом водорода в присутствии 3,75-кратного молярного излишка серной кислоты при $+20\text{ }^\circ\text{C}$. Содержание основного вещества в продуктах реакции по данным йодометрического титрования составляло 98–101%. Строение полученных соединений подтверждено результатами йодометрического титрования (определение активного кислорода), ИК-спектроскопии (Avatar 370, Thermo Nicolet).

Для получения кислоты уксусной разведенной смешивали 31,3 мас. ч. уксусной кислоты (х.ч., содержание основного действующего вещества не менее 98%, ООО «Биохим») и 68,7 мас. ч. воды дистиллированной. Содержание уксусной кислоты составляло 29,5–30,5%. Раствор калия йодида получали следующим образом: 10 г калий йодида растворяли в только что прокипяченной и охлажденной до комнатной температуры воде очищенной и довели объем раствора дистиллированной водой до 100 мл, полученный раствор должен быть бесцветным. 0,1 моль/л раствор натрия тиосульфата готовили по требованиям³.

Для проведения реакции эпексидирования (схема 1) использовали конические колбы на 75 мл с притертыми пробками. Мерная посуда и вспомогательные вещества класса А (1 класс)

отвечали требованиям⁴. Для нагрева и поддержания необходимой температуры реакционной смеси использовали воздушный термостат ТС — 80М (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ»).

Строение полученных продуктов эпексидирования доказывали с помощью ИК-спектроскопии. В спектре продуктов регистрируются полосы поглощения, соответствующие симметричным (1250 см^{-1}) и асимметричным ($950\text{--}810$, $840\text{--}750\text{ см}^{-1}$) валентным колебаниям связи С–О оксиранового фрагмента [14].

Методика определения ненасыщенности с использованием пероксидекановой (пероксиоктановой) кислоты. Точную навеску эфирного масла массой $\sim 0,1\text{ г}$ растворяли в конической колбе объемом 75 мл с притертой пробкой в 25,0 мл хлороформа или дихлорметана (метиленхлорид, бензол, хлороформ, этилацетат), вносили точную навеску пероксидекановой кислоты массой $\sim 0,2\text{ г}$, закупоренную колбу тщательно взбалтывали, после чего начинали отсчет времени.

В коническую колбу с помощью пипетки отбирали 1,00 мл полученного раствора, добавляли при интенсивном взбалтывании 4 мл уксусной кислоты разбавленной и 1 мл 10% раствора калий йодида и сразу же проводили титрование свободного йода 0,1 моль/л раствором натрия тиосульфата. Затем реакционную смесь оставляли на 0,5–2 ч, после чего определение активного кислорода повторяли по приведенной выше методике. Расчет содержания вещества (w, %) и йодного числа (I, г на 100 г вещества) проводили по формулам (1) и (2).

$$w = \frac{(V_0 - V_1) \times 0,1 \times K \times M \times V \times 100}{2 \times m \times 1000}, \quad (1)$$

$$I = \frac{(V_0 - V_1) \times 0,1 \times K \times 126,9 \times V \times 100}{m \times 1000}, \quad (2)$$

где V_0 — объем раствора натрия тиосульфата, израсходованный на титрование в контрольном

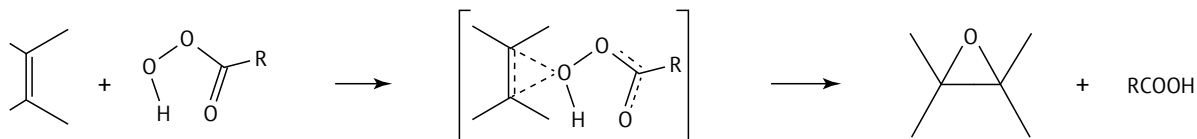


Схема 1. Реакция эпексидирования ненасыщенных соединений — образование эпексидов в результате присоединения кислорода пероксикарбоновой кислоты.

Scheme 1. Epoxidation of unsaturated compounds, i.e. epoxide formation by addition of oxygen from peroxycarboxylic acid.

³ ОФС.1.3.0002.15. Титрованные растворы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018

⁴ ОФС.1.1.0022.18. Мерная посуда. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

опыте (определение содержания пероксикислоты в растворе без пробы ненасыщенного определяемого соединения), мл; V_1 — объем раствора натрия тиосульфата, затраченный на титрование остатка пероксикислоты в опыте с пробой ненасыщенного определяемого соединения, мл; V — объем мерной колбы, мл; 0,1 — концентрация раствора натрия тиосульфата, моль/л; 126,9 — масса эквивалента йода, г/моль; m — навеска, г; 1000 — коэффициент пересчета в г; K — коэффициент поправки концентрации раствора натрия тиосульфата до 0,1000 моль/л; M — молекулярная масса определяемого вещества; 100 — перерасчет на 100 г эфирного масла.

Результаты и обсуждение

Кинетика эпексидирования ациклических моно-терпеноидов и окислителя в среде метилхлорида при температуре 298 К подчиняется кинетическому уравнению второго порядка (рис. 1–3). Для каждого объекта определяли оптимальное время прохождения реакции, устанавливали стехиометрическое соотношение реагентов и рассчитывали I .

Длительность реакции эпексидирования линалоола пероксиоктановой кислотой составляет не более 10 мин (рис. 1). Было установлено, что на 1 моль линалоола расходуется 1 моль пероксикислоты. Содержание основного действующего вещества при температуре

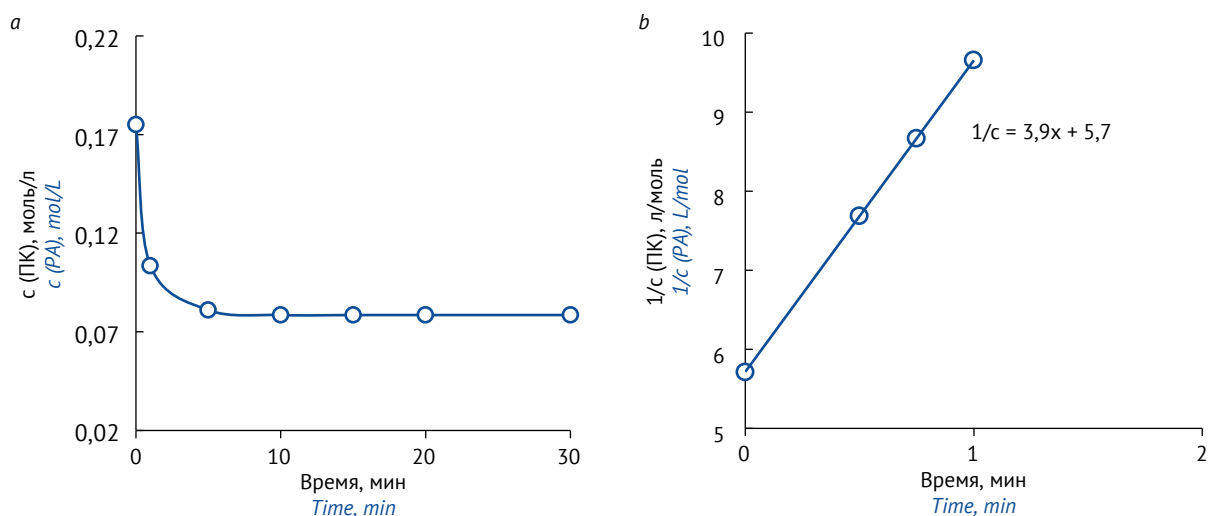


Рис. 1. Кинетические кривые реакции эпексидирования линалоола пероксиоктановой кислотой (ПК) в среде метилхлорида при 298 К: а — в прямых координатах, б — обращенно-концентрационная анаморфоза.

Fig. 1. Kinetic curves for linalool epoxidation with peroxyoctanoic acid (PA) in a methylene chloride medium at 298 K: concentration versus time (a) and inverse concentration versus time (b).

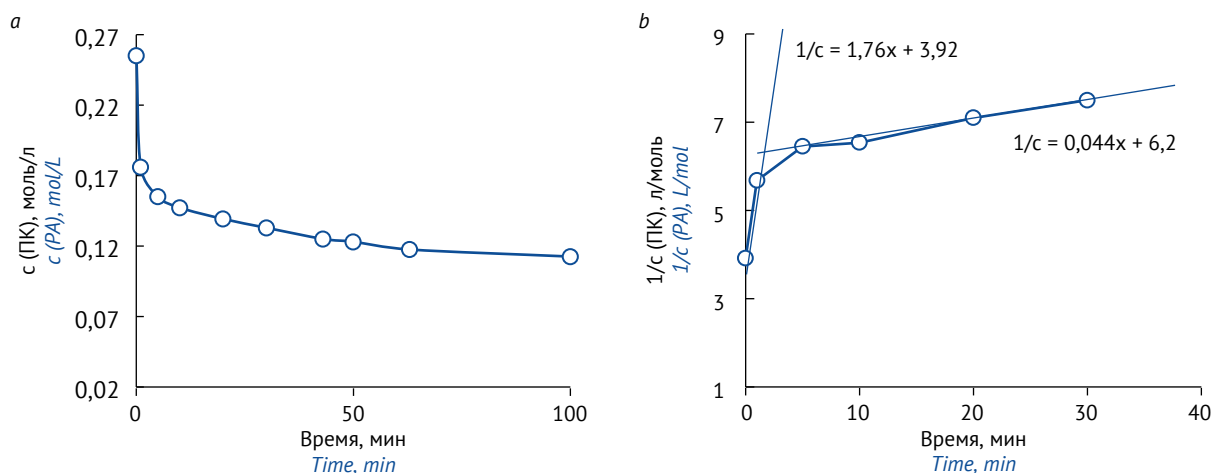


Рис. 2. Кинетические кривые реакции эпексидирования β -мирцена пероксиоктановой кислотой (ПК) в среде метилхлорида при 298 К: а — в прямых координатах, б — обращенно-концентрационная анаморфоза.

Fig. 2. Kinetic curves of β -myrcene epoxidation with peroxyoctanoic acid (PA) in a methylene chloride medium at 298 K: concentration versus time (a) and inverse concentration versus time (b).

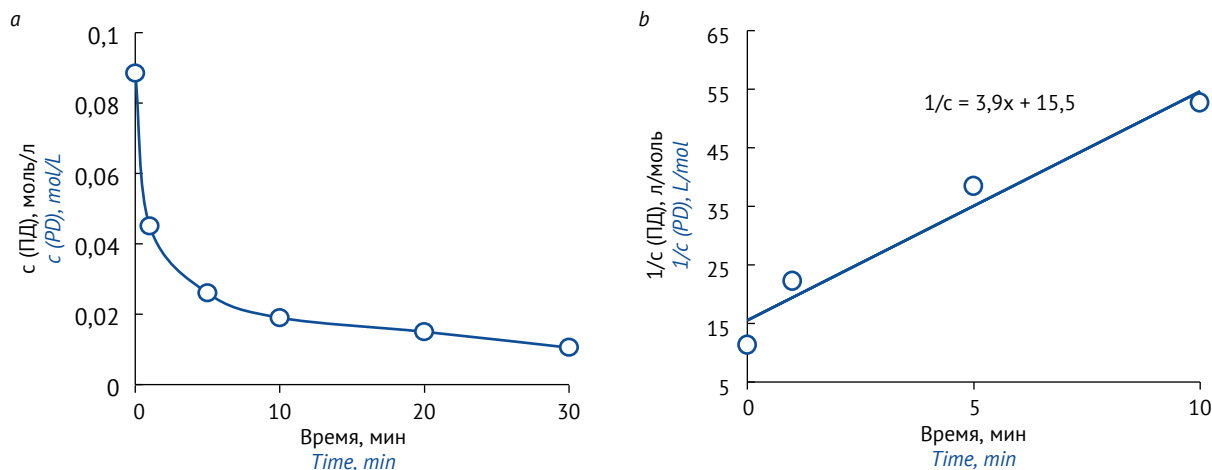


Рис. 3. Кинетические кривые реакции эпексидирования лимонного масла пероксидекановой кислотой (ПД) в среде метилхлорида при 297 К: а – в прямых координатах, б – обращенно-концентрационная анаморфоза.

Fig. 3. Kinetic curves of lemon oil epoxidation with peroxydecanoic acid (PD) in a methylene chloride medium at 297 K: concentration versus time (a) and inverse concentration versus time (b).

298 К через 10 мин составило 101,7%, йодное число, рассчитанное по уравнению (2), – 167,35 г на 100 г; теоретически рассчитанное йодное число – 164,6 г на 100 г. Исследования эпексидирования линалоола в различных средах (метилхлорид, бензол, хлороформ, этилацетат и др.) показали, что наиболее высокая скорость реакции наблюдается в среде метилхлорида ($3,9 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$). Наблюдения проводили при оптимальной температуре, при которой не наблюдается термического разрушения реагентов [10].

Время, которое необходимо для полного эпексидирования β -мирцена, составляет около 60 мин (рис. 2). Количество субстанции β -мирцена, рассчитанное по уравнению (1), составило 99,1%, йодное число, рассчитанное по уравнению (2), – 369 г / на 100 г (теоретически рассчитанное – 372,7 г / на 100 г). В реакции эпексидирования на 1 моль β -мирцена расходуется 2 моля пероксикислоты: объем титранта найден путем пересечения экстраполированных участков кинетических кривых. Первая стадия эпексидирования характеризуется более высокой скоростью реакции ($1,76 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$), скорость реакции, протекающей на второй стадии эпексидирования, ниже и составляет $0,044 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$.

Также была изучена кинетика эпексидирования лимонного масла – вещества, представляющего собой смесь различных ненасыщенных соединений терпеноидной структуры (рис. 3). Длительность эпексидирования лимонного масла с пероксидекановой кислотой в среде

метилхлорида при 297 К составила 30 мин, I – 243 г / на 100 г. Обращенно-концентрационная анаморфоза кинетической кривой является линейной функцией, эффективная константа скорости реакции второго порядка – $3,9 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$.

Основными компонентами лимонного масла являются лимонен (до 85%), β -терпинен (6%), β -мирцен (1,5%), нераль (1,1%) и другие ненасыщенные терпеноиды [15]. Скорость реакции эпексидирования основного компонента лимонена составляет $2,1 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ [7], что ниже значения, определенного в настоящей работе для эпексидирования лимонного масла. Такое различие, по-видимому, объясняется широкой номенклатурой ненасыщенных реакционно-активных соединений, содержащихся в лимонном масле.

Таким образом, определенные в нашем эксперименте скорость и длительность эпексидирования являются кажущимися величинами и представляют собой величину, нелинейно складывающуюся из кинетических параметров эпексидирования индивидуальных терпенов, входящих в состав лимонного масла. Следует отметить, что на данный момент степень ненасыщенности для эфирных масел Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. не регламентирует⁵.

В таблице 1 приведены результаты непрямого титрования некоторых растительных масел пероксикарбоновой кислотой (метод 1) и однохлористым йодом по Вийсу (референтный метод⁶). Значения, полученные по методу 1, в среднем

⁵ ОФС.1.5.2.0001.15. Эфирные масла. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

⁶ ОФС.1.2.3.0005.15. Йодное число. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

Таблица 1. Результаты определения йодного числа некоторых растительных жирных масел различными методами

Table 1. Iodine values of selected vegetable fatty oils determined by different test procedures

Образец масла* <i>Oil sample*</i>	Титрование пероксидекановой кислотой <i>Peroxydecanoic acid titration</i>		Реакция с ICl, йодное число, I, г / 100 г <i>Reaction with iodine monochloride, iodine value, I, g / 100 g</i>
	Йодное число**, I, г / 100 г <i>Iodine value**, I, g / 100 g</i>	Правильность методики титрования пероксидекановой кислотой, d, % <i>Peroxydecanoic acid titration accuracy, d, %</i>	
Кукурузное масло <i>Corn oil</i>	129,5	-1,1	131,0
Оливковое масло <i>Olive oil</i>	96,8	-1,7	98,5
Подсолнечное масло <i>Sunflower oil</i>	93,8	-13,3	108,2

* Торговые образцы масел, приобретенные на фермерских рынках, без дополнительной очистки (сырец).

** Все значения усреднены по пяти результатам определения. RSD $\leq \pm 3,3\%$ ($n = 5$; $P = 0,95\%$).

* Commercial oil samples from farmers' markets; no additional purification (raw oil).

** All values are averaged over five determinations. RSD $\leq \pm 3.3\%$ ($n = 5$; $P = 0.95\%$).

на 2–10% ниже, чем полученные референтным методом. Данный факт может быть объяснен тем, что в случае эпоксицирования реакция присоединения протекает количественно, а побочные процессы сведены к минимуму, а также тем, что содержание пероксидов, образующихся при хранении глицеридов ненасыщенных кислот, учитывается в холостом опыте.

Таким образом, предложенная методика определения степени ненасыщенности образца с использованием эпоксицирования позволяет оценить действительное содержание глицеридов высокомолекулярных ненасыщенных кислот в пробе масел. Выполнение измерений по данной методике не требует большого времени и может применяться как для образцов жирных масел [10], так и для образцов, содержащих эфирные масла. Длительность реакции не превышает 30 мин при комнатной температуре.

Нами рассчитаны йодные числа для некоторых терпеноидов (линалоол, мирцен) и лимонного

масла. Найденные йодные числа близки к теоретически рассчитанным йодным числам и могут быть использованы как дополнительный показатель при контроле качества субстанций и лекарственных форм.

Заключение

Разработана методика определения степени ненасыщенности (определения йодного числа) терпеноидов, а также растительных масел с использованием данных реакции эпоксицирования пероксидекановой кислотой в среде метилхлорида, которая может быть использована при контроле качества субстанций и лекарственных форм на их основе. В качестве показателя степени ненасыщенности эфирного масла предложено использовать йодное число. Представленная методика, основанная на титрометрии с использованием пероксикислот, может быть принята за основу метода количественного определения суммы ненасыщенных биологически активных веществ в эфирных маслах.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Паштетский ВС, Невкрытая НВ. Использование эфирных масел в медицине, ароматерапии, ветеринарии и растениеводстве (обзор). *Таврический вестник аграрной науки*. 2018;(1):16–32. Pashtetskiy VS, Nevkrytaya NV. The use of essential oils in medicine, aromatherapy, veterinary medicine and crop production (review). *Taurida Herald of the Agrarian Sciences*. 2018;(1):16–32 (In Russ.).
2. Пономарева ЕИ, Молохова ЕИ, Холов АК. Применение эфирных масел в фармации. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;(4):567. Ponomareva EI, Molokhova EI, Kholov AK. The usage of essential oils in pharmacy. *Modern Problems of Science and Education*. 2015;(4):567 (In Russ.).
3. Тихомиров АА. Принципы использования эфирных масел для медицинских целей. *Сборник науч-*

ных трудов Государственного Никитского ботанического сада. 2014;139:116–26.

Tikhomirov AA. Principles of essential oils use with the medical purposes. A literature review. *Collection of Scientific Works of the State Nikitsky Botanical Garden*. 2014;139:116–26 (In Russ.).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>

4. El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Ait Addi EH, Casabianca H, et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. *Int J Pharm*. 2015;483(1–2):220–43.
5. Сегуру НВ, Рудакова ИП, Вандышев ВВ, Самылина ИА. Методы контроля качества эфирных масел. *Фармация*. 2005;(3):3–5. Seguru NV, Rudakova IP, Vandyshev VV, Samylina IA. Methods of quality control of essential oils. *Pharmacy*. 2005;(3):3–5 (In Russ.).

6. Мелентьева ТА, Рудакова ИП, Самылина ИА. Разработка общих фармакопейных статей по определению показателей качества жирных и эфирных масел. *Фармация*. 2007;(2):3–4.
Melent'eva TA, Rudakova IP, Samylina IA. Development of general pharmacopoeia monographs on the determination of quality indicators of fatty and essential oils. *Pharmacy*. 2007;(2):3–4 (In Russ.).
7. Blazheyevskiy M.E, Agafonov O.M, Moroz VP, Ivashura MM. Quantitative determination of essential oil terpenoids by the reaction of epoxidation with peroxy decanoic acid. *J Chem Pharm Res*. 2014;6(3):1286–93.
8. Лапко ИВ, Аксенова ЮБ, Кузнецова ОВ, Василевский СВ, Аксенов АВ, Таранченко ВФ и др. Эфирные масла: методы определения подлинности и выявления фальсификации. Обзор. *Аналитика и контроль*. 2019;23(4):444–75.
Lapko IV, Aksenova YuB, Kuznetsova OV, Vasilevskiy SV, Aksenov AV, Taranchenko VF, et al. Essential oils: the review of the methods for determining the authenticity and detecting adulteration. *Analytics and Control*. 2019;23(4):444–75 (In Russ.).
<https://doi.org/10.15826/analitika.2019.23.4.010>
9. Meerwein H, Gerard L. Untersuchungen über intramolekulare Atomverschiebungen. I. Über die Anlagerung von Alkoholen an Camphen. *Justus Liebigs Ann Chem*. 1924;435(1):174–89.
<https://doi.org/10.1002/jlac.19244350104>
10. Блажеєвський М.Є., Агафонов О.М. Кількісне визначення ненасиченості жирних олій за реакцією епоксидування пероксидекановою кислотою. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2011;24(3):4–9.
Blazheyevskiy M.E, Agafonov O.M. Quantitative determination of unsaturation of fatty oils by the reaction of epoxidation with peroxidecanoic acid. *Current Issues in Pharmacy and Medicine: Science and Practice*. 2011;24(3):4–9 (In Ukr.).
11. Khalil N, Ashour M, Fikry S, Singab AN, Salama O. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of selected Apiaceous fruits. *Fut J Pharmaceut Sci*. 2018;4(1):88–92.
<https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.10.004>
12. Райхардт К. Растворители и эффекты среды в органической химии. М.: Мир; 1991.
Reichardt C. *Solvents and environmental effects in organic chemistry*. Moscow: Mir; 1991 (In Russ.).
13. Parker WE, Ricciuti C, Ogg CL, Swern D. Peroxides II. Preparation, characterization and polarographic behavior of longchain aliphatic peracids. *J Am Chem Soc*. 1955;77(15):4037–41.
14. Чулановский ВМ. Инфракрасные спектры поглощения полимеров и вспомогательных веществ. Л.: Химия; 1969.
Chulanovsky VM. *Infrared absorption spectra of polymers and excipients*. Leningrad: Khimiya; 1969 (In Russ.).
15. Мишарина ТА, Теренина МБ, Крикунова НИ, Калинин МА. Влияние состава эфирных масел лимона на их антиоксидантные свойства и стабильность компонентов. *Химия растительного сырья*. 2010;(1):87–92.
Misharina TA, Terenina MB, Krikunova NI, Kalinchenko MA. The influence of the composition of essential lemon oils on their antioxidant properties and the stability of the components. *Russ J Bioorg Chem*. 2011;(37):883–7.
<https://doi.org/10.1134/S1068162011070168>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.М. Агафонов — синтез пероксикарбоновых кислот, проведение эксперимента, интерпретация результатов работы, написание текста рукописи; И.П. Ремезова — написание и редактирование текста рукописи; В.В. Косенко — планирование эксперимента; Н.Д. Бунятян — обсуждение результатов эксперимента, формулирование выводов; Л.С. Аносова — анализ результатов, дизайн работы; В.А. Евтеев — обсуждение результатов эксперимента.

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. В.В. Косенко является главным редактором, Н.Д. Бунятян — членом редколлегии журнала «Ведомости НЦЭСМП. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Alexey M. Agafonov synthesised the peroxy-carboxylic acids, carried out the experiment, interpreted the study results, and drafted the manuscript. Irina P. Remezova drafted and edited the manuscript. Valentina V. Kosenko planned the experiment. Natalya D. Bunyatyan contributed to the discussion of the experimental results and formulated the conclusions. Lyudmila S. Anosova analysed the study results and designed the study. Vladimir A. Evteev contributed to the discussion of the experimental results.

Acknowledgements. The study was performed without sponsorship.

Conflict of interest. Valentina V. Kosenko is Editor-in-Chief of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*, Natalya D. Bunyatyan is a member of the Editorial Board of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*; the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Агафонов Алексей Михайлович.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0682-1366>
chuh2008@yandex.ru

Ремезова Ирина Петровна, д-р фарм. наук, доцент.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3456-8553>
i.p.remezova@pmedpharm.ru

Косенко Валентина Владимировна, канд. фарм. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>
kosenko@expmed.ru

Бунятян Наталья Дмитриевна, д-р фарм. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0936-5551>
bunyatyan@expmed.ru

Аносова Людмила Сергеевна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9380-4619>
apteka.nanya@yandex.ru

Евтеев Владимир Александрович.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6150-5796>
evteev@expmed.ru

Alexey M. Agafonov.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0682-1366>
chuh2008@yandex.ru

Irina P. Remezova, Dr. Sci. (Pharm.), Associate Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3456-8553>
i.p.remezova@pmedpharm.ru

Valentina V. Kosenko, Cand. Sci. (Pharm.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>
kosenko@expmed.ru

Natalya D. Bunyatyan, Dr. Sci. (Pharm.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0936-5551>
bunyatyan@expmed.ru

Lyudmila S. Anosova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9380-4619>
apteka.nanya@yandex.ru

Vladimir A. Evteev.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6150-5796>
evteev@expmed.ru

Статья поступила 01.08.2022

После доработки 21.11.2022

Принята к печати 21.11.2022

Online first 09.02.2023

Received 1 August 2022

Revised 21 November 2022

Accepted 21 November 2022

Online first 9 February 2023

Ведомости Научного центра экспертизы
средств медицинского применения

**Регуляторные исследования
и экспертиза лекарственных средств**



9 771991 291005