

2024

№ 3  
No. 3

Том 14,  
Vol. 14,

Regulatory research and medicine evaluation

ISSN 3034-3062 (Print)

# Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств



## ГЛАВНАЯ ТЕМА

Доклинические исследования:  
традиционные модели и современные подходы



[www.vedomostincesmp.ru](http://www.vedomostincesmp.ru)

## 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 (мутagenных) 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»



Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.11.2023 № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований»

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 читатели!

Благодаря существенному технологическому прогрессу, реализации государственных программ, внедрению технологий искусственного интеллекта в медицину и фармацевтику в последнее десятилетие наблюдается стремительное развитие доклинических исследований *in vitro*. Расширились возможности и повысилась надежность математического прогнозирования (*in silico*) при изучении лекарственных средств. Несмотря на происходящие изменения, доклинические исследования *in vivo* остаются наиболее информативными, позволяющими получить объективные сведения об эффективности и безопасности разрабатываемого лекарственного средства в отношении не только конкретного органа или системы, но и всего организма, первично охарактери-

зовать возможные риски фармакологической терапии и гарантировать возможность надлежащего перехода к клиническим исследованиям.

Отечественные и зарубежные практики нормативного регулирования планирования и проведения доклинических исследований нацелены на обеспечение качества и воспроизводимости результатов, стандартизацию и унификацию способов исследования. Накопленный научный опыт позволяет выбрать оптимальные экспериментальные модели, методы, методики и достичь цели исследования вне зависимости от степени изученности разрабатываемого лекарственного средства. Совершенствуются и этические аспекты доклинических исследований *in vivo*. Утверждено Руководство по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований (Рекомендации Коллегии ЕЭК от 14.11.2023 №33). Внедряются техники, направленные на исключение или существенную минимизацию боли и дистресса у лабораторных животных. Все это позволяет составлять оптимальные, а главное, достаточные программы доклинических исследований, учитывающие особенности конкретного лекарственного средства. Отдельно отмечу, что принцип «больше – значит лучше» к исследованиям *in vivo* неприменим.

В данный выпуск журнала включены статьи, касающиеся изучения эффективности и безопасности лекарственных препаратов и определения их фармакокинетических параметров. Особое внимание уделено вопросам разработки и валидации биоаналитических методик, использующихся в доклинических исследованиях.

Представленная в статьях информация имеет высокую практическую значимость и будет способствовать совершенствованию методологии проведения доклинических исследований любой сложности и повышению их результативности и качества на всех этапах.

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](mailto:Fedotovaof@expmed.ru)

## Ответственный редактор:

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

## Ответственный редактор тематического выпуска:

**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**

## Менеджер по развитию:

**Мжельский Александр Анатольевич**

## 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](mailto:vedomosti@expmed.ru)

[www.vedomostincesmp.ru](http://www.vedomostincesmp.ru)

Журнал основан в 1999 году.

Предыдущее название журнала:  
Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств (до мая 2024 г.)

Выходит шесть раз 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), RUSMED, 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 – 0,5.

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 (категория К1).

В журнале освещаются передовые достижения в сфере 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 высокотехнологические 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.

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

Подписано в печать:	28.06.2024
Дата выхода в свет	06.07.2024
Подписной индекс	в каталоге «Пресса России» – 57942
	в каталоге агентства «Урал-Пресс» – 57942

© Оформление, составление. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2024

## 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)

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

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

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

**Глаголев Сергей Владимирович**, Минздрав России (Москва, Россия)

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

**Гурина Наталия Сергеевна**, д-р биол. наук, проф., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Республика Беларусь)

**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)

**Елизарова Ольга Сергеевна**, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

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

**Кайтель Сьюзан**, Ph.D. (Бонн, Германия)

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

**Кодина Галина Евгеньевна**, канд. хим. наук, доцент (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)

**Потанина Ольга Георгиевна**, д-р фарм. наук, проф., МГУ им. М.В. Ломоносова (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)

**Ягудина Роза Исмаиловна**, д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, 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

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

Founded in 1999.

The journal was named Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation until May 2024.

Published six times 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), Russian Science Citation Index (RSCI), and RUSMED, 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 0.5.

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 (Category K1).

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

## 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](mailto:Fedotovaof@expmed.ru)

## Executive Editor:

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

## Guest Editor for the Special Issue:

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

## Science Editors:

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

## Editor:

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

## Translation Editor:

**Liubov A. Baltina**

## Development Manager:

**Alexander A. Mzhelsky**

## 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](mailto:vedomosti@expmed.ru)

[www.vedomostincesmp.ru](http://www.vedomostincesmp.ru)

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

**Passed for printing:** 28.06.2024

**Date of publication:** 06.07.2024

**Subscription codes** Pressa Rossii catalogue: 57942

Ural-Press agency catalogue: 57942

© Compilation, design. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 2024

## Editorial Board

---

### Editor-in-Chief

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

### Deputy Editors-in-Chief

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

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

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

### Executive Secretary

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

---

### Editorial Board Members

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

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

**Natalia S. Gurina**, Dr. Sci. (Biol.), Belarusian State Medical University (Minsk, Republic of Belarus)

**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 Medical University (Kazan, Russia)

**Olga S. Elizarova**, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

**Edwin E. Zvartau**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician I.P. Pavlov First St 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)

**Galina E. Kodina**, Cand. Sci. (Chem.), Assoc. Prof. (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)

**Olga G. Potanina**, Dr. Sci. (Pharm.), Lomonosov Moscow State 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)

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

<b>Registration</b>	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
<b>Contract publisher</b>	NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114
<b>Printing office</b>	Triada Publishing House: 9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver 170034
<b>Print run</b>	150 copies. Free price

# Содержание

Том 14, №3 2024

<b>ГЛАВНАЯ ТЕМА:</b>		<b>ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ: ТРАДИЦИОННЫЕ МОДЕЛИ И СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ</b>
		<b>АВТОРИТЕТНОЕ МНЕНИЕ</b>
<i>М.Н. Макарова</i>	<b>248</b>	Доклинические исследования в цикле разработки лекарственных средств
		<b>НОРМАТИВНОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ И РЕКОМЕНДАЦИИ</b>
<i>О.Е. Клементьева, А.В. Смирнова, Н.Ю. Кульбачевская, Е.Ю. Григорьева, Ю.С. Лагодзинская, Т.Г. Геворкян</i>	<b>251</b>	Доклинические исследования радиофармацевтических лекарственных препаратов: анализ зарубежной и отечественной практики нормативного регулирования: обзор
		<b>БЕЗОПАСНОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ</b>
<i>Н.С. Ильинский, М.А. Тюнин, С.В. Чепур, В.А. Пугач, В.А. Мясников</i>	<b>265</b>	Практические аспекты функциональной оценки токсических поражений периферической нервной системы в доклинических исследованиях на грызунах: обзор
<i>М.В. Мирошников, К.Т. Султанова, М.Н. Макарова, Н.М. Фаустова, С.О. Хан, Е.А. Лосева</i>	<b>283</b>	Комплексная оценка функционального состояния мочевыделительной системы в доклинических исследованиях. Часть 1. Инструментальные и лабораторные методы оценки (обзор)
<i>А.О. Вернер, Т.М. Устинова, Н.Г. Венгеревич</i>	<b>295</b>	Оптимизация методики приготовления цитогенетических препаратов при проведении метафазного анализа клеток костного мозга млекопитающих <i>in vivo</i>
		<b>БИОАНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ</b>
<i>И.И. Яичков, А.Л. Хохлов, М.К. Корсаков, А.А. Шетнев, Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов</i>	<b>304</b>	Изучение фармакокинетики нового производного изоксазола на крысах с применением ВЭЖХ-МС/МС для анализа проб крови
<i>Ю.А. Никонова, С.Г. Аббасова, П.Е. Каргополова, О.М. Стрижакова, И.В. Лягоскин, А.П. Васильев, А.С. Першин</i>	<b>317</b>	Валидация методики оценки биологической активности лекарственного препарата на основе тоцилизумаба и определение критериев приемлемости результатов анализа
<i>Т.А. Батуашвили, Е.О. Чечетова, П.В. Шадрин, Н.П. Неугодова</i>	<b>330</b>	Определение биологической активности гонадотропинов на крысах беспородных и линии Sprague Dawley. Часть 2. Определение биологической активности лютеинизирующего гормона
		<b>КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>
<i>О.В. Шредер, Д.В. Горячев, В.А. Меркулов</i>	<b>338</b>	Основные принципы расчета необходимой численности участников клинических исследований. Часть 1. Общие подходы (обзор)
<i>А.П. Соловьева, И.М. Сурмило</i>	<b>351</b>	Программа изучения лекарственных препаратов для лечения генерализованного тревожного расстройства: анализ Рекомендаций Европейского агентства по лекарственным средствам
		<b>МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ</b>
<i>О.В. Гунар, Г.М. Булгакова</i>	<b>362</b>	Совершенствование микробиологических методик анализа качества нестерильных лекарственных средств, обладающих антимикробным действием
		<b>ЭКСПЕРТНОЕ МНЕНИЕ</b>
<i>О.А. Ваганова, А.А. Натыкан</i>	<b>370</b>	Рекомендации по оформлению раздела нормативной документации на лекарственные средства: вода (определение методом Фишера)

# Contents

Volume 14, No. 3 2024

<b>MAIN TOPIC:</b>		<b>NON-CLINICAL STUDIES: TRADITIONAL MODELS AND MODERN APPROACHES</b>
		<b>AUTHORITATIVE OPINION</b>
<i>M.N. Makarova</i>	<b>248</b>	Preclinical Studies in the Pharmaceutical Development Cycle
		<b>REGULATORY PRACTICE AND RECOMMENDATIONS</b>
<i>O.E. Klementyeva, A.V. Smirnova, N.Yu. Kulbachevskaya, E.Yu. Grigorieva, Yu.S. Lagodzinskaya, T.G. Gevorkyan</i>	<b>251</b>	Non-clinical Studies of Radiopharmaceuticals: Analysis of National and International Regulatory Practice (Review)
		<b>SAFETY OF MEDICINES</b>
<i>N.S. Ilinskii, M.A. Tyunin, S.V. Chepur, V.A. Pugach, V.A. Myasnikov</i>	<b>265</b>	Practical Aspects of Assessing Toxic Lesions of the Peripheral Nervous System in Preclinical Studies in Rodents: A Review
<i>M.V. Miroshnikov, K.T. Sultanova, M.N. Makarova, N.M. Faustova, S.O. Khan, E.A. Loseva</i>	<b>283</b>	Complex Assessment of the Functional State of the Urinary System in Preclinical Studies. Part 1. Instrumental and Laboratory Assessment Methods (Review)
<i>A.O. Verner, T.M. Ustinova, N.G. Vengerovich</i>	<b>295</b>	Optimisation of a Cytogenetic Sample Preparation Procedure for <i>In Vivo</i> Metaphase Analysis of Mammalian Bone Marrow Cells
		<b>BIOANALYTICAL METHODS</b>
<i>I.I. Yaichkov, A.L. Khokhlov, M.K. Korsakov, A.A. Shetnev, N.N. Volkhin, S.S. Petukhov</i>	<b>304</b>	Pharmacokinetics Study of a New Isoxazole Derivative in Rats Using HPLC–MS/MS for Blood Sample Analysis
<i>Yu.A. Nikonova, S.G. Abbasova, P.E. Kargopolova, O.M. Strizhakova, I.V. Lyagoskin, A.P. Vasilev, A.S. Pershin</i>	<b>317</b>	Validation of an Analytical Procedure for Evaluating the Biological Activity of a Medicinal Product Based on Tocilizumab and Determination of Acceptance Criteria for Test Results
<i>T.A. Batuashvili, E.O. Chechetova, P.V. Shadrin, N.P. Neugodova</i>	<b>330</b>	Determination of Biological Activity of Gonadotrophins in Randombred and Sprague Dawley Rats. Part 2. Determination of Biological Activity of Luteinising Hormone
		<b>CLINICAL TRIAL</b>
<i>O.V. Shreder, D.V. Goryachev, V.A. Merkulov</i>	<b>338</b>	Basic Principles for Calculating the Required Number of Participants in Clinical Trials. Part 1. Common Approaches (Review)
<i>A.P. Solovyova, I.M. Surmilo</i>	<b>351</b>	Programme for Studying Medicinal Products for Generalised Anxiety Disorder: Analysis of the European Medicines Agency Guideline
		<b>MICROBIOLOGICAL TESTING</b>
<i>O.V. Gunar, G.M. Bulgakova</i>	<b>362</b>	Improvement of Microbiological Methods for Testing the Quality of Non-sterile Medicines with Antimicrobial Effects
		<b>EXPERT OPINION</b>
<i>O.A. Vaganova, A.A. Natykan</i>	<b>370</b>	Recommendations for the Content of a Product Specification File: Water (Karl Fischer Method)



**Марина МАКАРОВА:**  
«Доклинические исследования занимают  
важнейшее место в цикле разработки  
лекарственных средств»

**Marina N. Makarova:**  
“Preclinical studies are the most important component  
of the pharmaceutical development cycle”

М.Н. Макарова

## Доклинические исследования в цикле разработки лекарственных средств

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

✉ Макарова Марина Николаевна; [makarova.mn@doclinika.ru](mailto:makarova.mn@doclinika.ru)

### РЕЗЮМЕ

Конечной целью доклинических исследований является получение данных, которые позволят сделать выводы о возможном воздействии нового лекарственного средства на организм человека и надлежащим образом перейти к клиническим исследованиям. В интервью своими взглядами в отношении проведения доклинических исследований в России поделилась директор АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» доктор медицинских наук Марина Николаевна Макарова.

**Ключевые слова:** доклинические исследования; испытательный центр; лабораторные животные

**Для цитирования:** Макарова М.Н. Доклинические исследования в цикле разработки лекарственных средств. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2024;14(3):248–250. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-248-250>

Marina N. Makarova

## Preclinical Studies in the Pharmaceutical Development Cycle

Research-and-manufacturing company “HOME OF PHARMACY”,  
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement, Vsevolozhsky  
district, Leningrad region 188663, Russian Federation

✉ Marina N. Makarova; [makarova.mn@doclinika.ru](mailto:makarova.mn@doclinika.ru)

### ABSTRACT

The ultimate goal of preclinical studies is to generate data that can be used to make conclusions about the potential effects of a new medicine on the human body and to properly proceed to clinical trials. In this interview, Marina N. Makarova, Doctor of Medical Sciences, Director of the RMC “HOME OF PHARMACY”, shares her views on conducting preclinical studies in Russia.

**Keywords:** preclinical studies; testing centre; laboratory animals

**For citation:** Makarova M.N. Preclinical studies in the pharmaceutical development cycle. *Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2024;14(3):248–250. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-248-250>

Доклинические исследования – один из самых сложных, дорогостоящих и ответственных процессов в цикле разработки лекарственных средств, самым тесным образом связанных с фармацевтической разработкой и последующими клиническими исследованиями. Уже на этапе отбора лучших молекул-кандидатов перед учеными стоит задача установить эффективность и безопасность будущего нового препарата. Перед тем как вещество преодолеет путь до применения в клинической практике, его тщательно исследуют, как правило, с использованием лабораторных животных. Полной альтернативы этому подходу пока не придумали, но мы верим, что наступит то время, когда для оценки лекарственного вещества не нужно будет причинять страдания ни одному животному, а все исследования будут проводиться на искусственных моделях. Работа в этом направлении ведется, и весьма активно. Именно на этапе доклинических исследований ученые сегодня находят все больше новых способов подтвердить биологические эффекты новых веществ – *in silico* с помощью компьютерных моделей и *in vitro* на клеточных культурах – и выяснить, стоит ли той или иной молекуле-кандидату вообще попадать в живой организм и какие побочные эффекты она может вызвать. Но полностью отказаться от использования лабораторных животных при доклинических исследованиях вряд ли получится.

Одним из значимых центров по проведению доклинических исследований в России является АО «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ». О некоторых аспектах «доклиники» – интервью с его директором доктором медицинских наук Мариной Николаевной МАКАРОВОЙ.

**– Марина Николаевна, какие доклинические центры существуют сегодня в России и на каких исследованиях они специализируются?**

В Российской Федерации существует более 100 государственных и частных центров, которые специализируются на проведении разных типов доклинических исследований. Первые лаборатории, проводящие оценку эффективности и безопасности лекарственных средств, были организованы на базах научно-исследовательских институтов, и их специализация определялась основным направлением института. Современные центры чаще всего проводят широкий спектр доклинических исследований как в отношении типов исследований, так и в отношении групп препаратов. Но всегда есть какое-то «но». Одни эксперименты требуют специального материально-технического оснащения, другие – отдельных помещений с четко заданными

параметрами или специальных разрешений. К примеру, для деятельности в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных требуется специальная лицензия. Есть центры, которые специализируются на очень частных вопросах доклинических исследований без участия животных, например математическом прогнозировании (компьютерном моделировании) при изучении токсичности химических веществ, – то, что мы называем *in silico*, другие центры для проведения исследований используют водных позвоночных моделей (например, рыб зебрарио) и т.д.

**– Раз мы заговорили об *in silico* методах, как вы думаете, возможен ли полный отказ от проведения исследований на лабораторных животных?**

Несмотря на постоянное совершенствование методов *in silico* и *in vitro*, они имеют ряд ограничений и могут мало говорить о том, как препарат поведет себя в реальных клетках и тем более в организме животного или человека, и, значит, пока не могут полностью заменить животные модели, поэтому проведение доклинических исследований лекарственных препаратов с использованием млекопитающих по-прежнему остается самым востребованным из всех существующих подходов. Иными словами, на сегодня полное исключение лабораторных животных как тест-систем невозможно. При планировании исследований мы всегда стараемся минимизировать число животных: любое исследование должно быть достаточным и проводиться только в том случае, если оно позволяет получить новые сведения о лекарственном средстве. Британский совет по биоэтике сформулировал это так: «Использование животных в исследованиях – это привилегия, предоставленная обществом исследовательскому сообществу в ожидании того, что такое использование либо даст значительные новые знания, либо приведет к улучшению благополучия людей».

**– А что сейчас делается в России и в мире в отношении благополучия лабораторных животных?**

За последние 5 лет как в мире в целом, так и в нашей стране многое сделано в этом отношении, начиная с совершенствования законодательства: в конце 2023 г. принято Решение Коллегии ЕЭК № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований», которое предусматривает более жесткий этический контроль в отношении лабораторных животных и открытость научных исследований. К примеру, при подаче в научный журнал рукописи статьи, содержащей результаты экспериментального исследования на животных, авторы обязательно должны указывать

данные о соблюдении институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных и делиться ходом таких исследований. Это позволяет другим ученым воспроизвести результаты и существенно повышает ценность научной работы.

На обеспечение благополучия лабораторных животных и обучение принципам гуманного обращения с ними направлены также различные обучающие мероприятия – семинары, школы, научные конференции. Существенный вклад в этот процесс вносит Ассоциация специалистов по лабораторным животным Rus-LASA. В июле наши коллеги на конференции GLP-PLANET V представят мастер-класс «Оценка проектов исследований на животных в комиссии по биоэтике».

**– Марина Николаевна, вы являетесь руководителем научной организации, которая занимается проведением доклинических исследований лекарственных препаратов. Расскажите, пожалуйста, какие виды лабораторных животных наиболее востребованы в вашей работе?**

АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», которым я руководжу, проводит исследования фармакодинамики, фармакокинетики и безопасности *in vitro* и *in vivo* практически всех видов лекарственных средств, кроме радиофармацевтических и некоторых других препаратов, исследование которых требует специальных разрешений и соответствующего технического оснащения. В своей работе мы используем грызунов (мышей, крыс, морских свинок), кроликов, в последнее время чаще стали проводить исследования на более высокоорганизованных животных – собаках, карликовых свиньях, хорьках и приматах. Выбор наиболее подходящего вида животных связан с динамическими изменениями потребностей отечественного фармацевтического рынка и с необходимостью получения наиболее качественных результатов исследований, которые впоследствии будут транслироваться на человека.

**– Что, по-вашему, сегодня определяет качество доклинических исследований? Является ли GLP-статус эксперимента гарантом получения достоверных данных?**

Безусловно, GLP – общепринятый международный стандарт, обеспечивающий согласованность и достоверность результатов лабораторных исследований. Но он не является единственным инструментом, определяющим качество доклинических исследований. Существуют и другие механизмы, позволяющие повышать качество планирования и проведения исследований. Взять

хотя бы группу стандартов ISO, которые составляют основу системы менеджмента качества любой организации вне зависимости от сферы ее профессиональной деятельности и которые мы сами активно используем в технологических процессах нашего испытательного центра.

В своей профессиональной деятельности мы также используем принципы, описанные в международном стандарте ARRIVE 2.0 (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments; Исследования на животных: отчетность об экспериментах *in vivo*). Не так давно элементы ARRIVE 2.0 были внедрены во внутреннюю нормативную документацию нашего испытательного центра, что позволило оптимизировать работу научного звена на всех этапах научно-исследовательской работы. Стандарт ARRIVE 2.0 я сама использую как рецензент при оценке рукописей статей. В целом считаю, что интеграция различных стандартов и руководств в единую систему менеджмента качества является надежным инструментом, позволяющим проводить качественные исследования, отвечающие международным требованиям.

**– Какие вы могли бы назвать проблемы в сфере доклинических исследований?**

Главной проблемой, на мой взгляд, является так называемый «кадровый голод». В нашей профессии он ощущается особенно остро, ведь тому, как проводить доклинические исследования, не учит ни один вуз в рамках высшего образования. В последние годы начали появляться магистратуры по направлению «Биомедицина и доклинические исследования лекарственных препаратов», но результативность этой программы мы сможем оценить только через несколько лет. Другая проблема – необходимость импортозамещения. Это касается как приобретения самих животных, так и обеспечения их жизнедеятельности. Наконец, третья проблема – это относительно низкая публикационная активность отечественных ученых, которая во многом определяется тем, что заказчики доклинических исследований по тем или иным причинам, например связанным с правами интеллектуальной собственности, не готовы обнародовать полученные результаты.

Мы ожидаем, что эти и другие проблемы в области доклинических исследований лекарственных препаратов будут решаться комплексно в рамках выполнения масштабных задач по обеспечению нашей страны отечественными лекарственными средствами, в том числе высокотехнологичными.

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук / Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>



О.Е. Клементьева<sup>1</sup>   
А.В. Смирнова<sup>1,2</sup>   
Н.Ю. Кульбачевская<sup>1</sup>   
Е.Ю. Григорьева<sup>1</sup>   
Ю.С. Лагодзинская<sup>1</sup>   
Т.Г. Геворкян<sup>1</sup>

## Доклинические исследования радиофармацевтических лекарственных препаратов: анализ зарубежной и отечественной практики нормативного регулирувания (обзор)

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Каширское ш., д. 24, стр. 23, Москва, 115478, Российская Федерация

<sup>2</sup> Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский  
клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова  
Департамента здравоохранения г. Москвы»  
Новогиреевская ул., д. 1, корп. 1, Москва, 111123, Российская Федерация

✉ Смирнова Анна Вячеславна; [a.smirnova@ronc.ru](mailto:a.smirnova@ronc.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Доклинические исследования (ДКИ) радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП) в России и Евразийском экономическом союзе (ЕАЭС) в настоящее время проводятся в соответствии с общими рекомендациями, применимыми для других групп лекарственных препаратов, но не учитывающими особенности РФЛП.

**ЦЕЛЬ.** Обоснование необходимости разработки методических рекомендаций по проведению ДКИ РФЛП с учетом мировой регуляторной практики.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Проведен анализ руководств по ДКИ в Российской Федерации и ЕАЭС, зарубежной литературы, а также руководств Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (FDA), Европейского агентства по лекарственным средствам (EMA) и Международного агентства по атомной энергии (МАГАТЭ) в части проведения ДКИ РФЛП. Показано, что необходима унификация используемой терминологии. Рассмотрены свойства РФЛП, которые не позволяют при проведении ДКИ использовать рекомендации, применимые для других групп препаратов. Отмечено, что исследования субхронической токсичности терапевтических РФЛП на нерадиоактивном препарате не позволяют оценить вклад излучения радионуклида в биологические эффекты препарата. Предложено проводить изучение системной токсичности готовой лекарственной формы РФЛП по протоколу хронической токсичности с однократным введением.

**ВЫВОДЫ.** Разработка современных методических руководств по проведению ДКИ РФЛП и их внедрение в практику необходимы для снижения возможных рисков медицинского применения данной группы лекарственных средств. Необходимо учесть различия требований к РФЛП диагностического и терапевтического назначения с учетом правил обеспечения радиационной безопасности. При разработке руководств по ДКИ РФЛП следует ориентироваться на руководства FDA, EMA и МАГАТЭ. Необходимо рассмотреть вопросы о перечне обязательных и об исключении неинформативных исследований из требований к данной группе препаратов.

**Ключевые слова:** радиофармацевтический препарат; доклинические исследования; методические рекомендации; руководство по доклиническим исследованиям

**Для цитирования:** Клементьева О.Е., Смирнова А.В., Кульбачевская Н.Ю., Григорьева Е.Ю., Лагодзинская Ю.С., Геворкян Т.Г. Доклинические исследования радиофармацевтических лекарственных препаратов: анализ зарубежной и отечественной практики нормативного регулирования (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):251–264. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-251-264>

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Olga E. Klementyeva<sup>1</sup>   
Anna V. Smirnova<sup>1,2</sup>   
Natalia Yu. Kulbachevskaya<sup>1</sup>   
Elena Yu. Grigorieva<sup>1</sup>   
Yulia S. Lagodzinskaya<sup>1</sup>   
Tigran G. Gevorkyan<sup>1</sup>

## Non-clinical Studies of Radiopharmaceuticals: Analysis of National and International Regulatory Practice (Review)

<sup>1</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 24/23 Kashirskoe Hwy, Moscow 115478, Russian Federation

<sup>2</sup> Moscow Clinical Scientific and Practical Center named after A. S. Loginov, 1/1 Novogireevskaya St., Moscow 111123, Russian Federation

✉ Anna V. Smirnova; [a.smirnova@ronc.ru](mailto:a.smirnova@ronc.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Currently in the Russian Federation and the Eurasian Economic Union (EAEU), the conduct of non-clinical studies of radiopharmaceuticals is regulated by general guidelines on non-clinical studies, which are applicable to multiple groups of medicinal products but do not accommodate the characteristics of radiopharmaceuticals.

**AIM.** The study aimed to substantiate the need for methodological guidelines regulating non-clinical studies of radiopharmaceuticals, taking into account global regulatory practice.

**DISCUSSION.** The authors analysed the Russian and EAEU guidelines regulating non-clinical studies in general as well as international publications on non-clinical studies of radiopharmaceuticals, including guidelines by the US Food and Drug Administration (FDA), the European Medicines Agency (EMA), and the International Atomic Energy Agency (IAEA). The analysis revealed the need for terminology harmonisation. This article describes the aspects specific to radiopharmaceuticals that limit the applicability of general guidelines to non-clinical studies of radiopharmaceuticals. Subchronic toxicity studies based on inactive formulations do not account for the contribution of radionuclide emission to the biological effects of therapeutic radiopharmaceuticals. The authors suggest that systemic toxicity studies of finished dosage forms should use single-dose chronic toxicity protocols.

**CONCLUSIONS.** It is necessary to develop and implement up-to-date methodological guidelines for conducting non-clinical studies of radiopharmaceuticals to reduce potential risks in the application of these medicinal products. This requires factoring in different requirements for diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals, with due consideration of radiation safety requirements. When drafting guidelines for non-clinical studies of radiopharmaceuticals, regulators should keep in mind the applicable guidelines by the FDA, EMA, and IAEA. A list of mandatory studies should be compiled, and uninformative studies should be excluded from the requirements for radiopharmaceuticals.

**Keywords:** radiopharmaceuticals; non-clinical studies; methodological guidelines; non-clinical guidelines

**For citation:** Klementyeva O.E., Smirnova A.V., Kulbachevskaya N.Yu., Grigorieva E.Yu., Lagodzinskaya Yu.S., Gevorkyan T.G. Non-clinical studies of radiopharmaceuticals: analysis of national and international regulatory practice (review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):251–264. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-251-264>

**Funding.** The study was performed without external funding.

**Disclosure.** The authors declare having no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Преимущества методов ядерной медицины и их незаменимость для лечения ряда заболеваний обусловили устойчивое развитие данной отрасли на протяжении нескольких последних десятилетий как неотъемлемой части мировой клинической практики. Из года в год увеличивается количество научных исследований по разработке новых радиофармацевтических препаратов (РФЛП), включая и их доклинические исследования (ДКИ).

В сложившихся реалиях разработка и применение в клинической практике отечественных РФЛП является приоритетной задачей, над решением которой работают научные коллективы ведущих научных центров Российской Федерации. При этом без решения ряда вопросов, связанных с нормативным регулированием ДКИ РФЛП, невозможно получение разрешения на проведение клинических исследований нового препарата.

К сожалению, ДКИ РФЛП фактически выпадают из рамок нормативно-правового поля в России и Евразийском экономическом союзе (ЕАЭС). В настоящее время в государствах – членах ЕАЭС ДКИ РФЛП выполняются в соответствии с общими рекомендациями и методическими указаниями, применимыми для всех лекарственных препаратов (ЛП). Поэтому методология и дизайн исследований, а следовательно, и объем информации, полученной в различных исследовательских центрах, значительно отличаются.

Также не выделены различия в проведении ДКИ двух отдельных групп РФЛП: диагностических и терапевтических. Все это значимо влияет на возможность внедрения РФЛП в клиническую практику и вызывает дискуссии о том, какими нормами и правилами необходимо руководствоваться при проведении ДКИ РФЛП.

Цель работы – обоснование необходимости разработки методических рекомендаций по проведению доклинических исследований радиофармацевтических лекарственных препаратов с учетом мировой регуляторной практики.

В работе был использован информационно-аналитический метод исследования. Проанализированы нормативно-правовые акты и методические рекомендации по проведению ДКИ лекарственных средств в Российской Федерации и за рубежом:

- [Федеральный закон Российской Федерации № 61-ФЗ от 12.04.2010](#) «Об обращении лекарственных средств» (закон № 61-ФЗ);

- [Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 78 от 03.11.2016](#) «О правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения»;
- [Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 81 от 03.11.2016](#) «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики ЕАЭС в сфере обращения лекарственных средств»;
- [Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии № 202 от 26.11.2019](#) «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов»;
- [Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии № 10 от 21.05.2020](#) «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения»;
- [ГОСТ 33044–2014](#) «Принципы надлежащей лабораторной практики»;
- Хабриев Р.У., ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: 2005;
- Миронов А.Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012;
- [Nonclinical evaluation of late radiation toxicity of therapeutic radiopharmaceuticals](#). Guidance for industry. Food and Drug Administration; 2011;
- [Oncology therapeutic radiopharmaceuticals: Nonclinical studies and labeling recommendations](#). Guidance for industry. Food and Drug Administration; 2018;
- [Microdose radiopharmaceutical diagnostic drugs: Nonclinical study recommendations](#). Guidance for industry. Food and Drug Administration; 2018;
- [Guideline on the non-clinical requirements for radiopharmaceuticals](#). European Medicines Agency; 2018. EMA/CHMP/SWP/686140/2018.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### Ключевые определения и термины

Единообразие, точность и однозначная трактовка используемых терминов необходимы для продуктивного взаимодействия спонсора ДКИ, исследовательской лаборатории (центра) и регуляторных органов, уполномоченных принимать решения о проведении клинических исследований и регистрации препарата.

Согласно определению, данному в Государственной фармакопее Российской Федерации<sup>1</sup>, РФЛП – это ЛП, содержащий в готовом для применения состоянии один или несколько радионуклидов (радиоактивных изотопов) в качестве действующего вещества или в составе действующего вещества. Применение к РФЛП исторически устоявшейся формулировки, определяющей их как лекарственные, зачастую приводит к возникновению замечаний экспертов, оценивающих полноту необходимого объема выполненных ДКИ при рассмотрении запроса о разрешении на проведение клинических исследований и экспертизе регистрационного досье. Согласно определению<sup>2</sup>, РФЛП диагностического назначения содержат гамма- или позитрон-излучающий радионуклид, являющийся информационным носителем, излучение которого, проникающее за пределы организма, регистрируется внешними детекторами.

Использование для радионуклидов термина «информационный носитель» является еще одним примером неточности и неоднозначности терминологии. Эта формулировка встречается во всех изданиях Государственной фармакопее Российской Федерации начиная с XII изд. (2008 г.). В других документах, содержащих официальное определение РФЛП (Фармакопея США, Европейская фармакопея, документы Международного агентства по атомной энергии (МАГАТЭ) и Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA)), такой термин не употребляется.

В большинстве случаев химические соединения, входящие в состав диагностических РФЛП, используются в количествах, не оказывающих фармакологического действия. В РФЛП терапевтического назначения радионуклид (бета-, альфа-излучатель, распад которого сопровождается электронным захватом или внутренней конверсией электронов) является основным источником терапевтического воздействия, позволяющим локализовать лечебную дозу излучения непосредственно в органе-мишени

и, соответственно, обеспечить минимальное облучение здоровых органов и тканей.

В действующем издании Фармакопее ЕАЭС<sup>3</sup> определение РФЛП не приводится. В проекте фармакопейной статьи «Радиофармацевтические лекарственные препараты», одобренной для включения в ч. 3 т. 1 Фармакопее ЕАЭС, определение РФЛП полностью соответствует тексту закона № 61-ФЗ, и понятие «информационный носитель» относительно радионуклидов не используется.

Под понятиями «план» и «протокол ДКИ» понимается документ, в котором описываются объем, объект и субъекты исследования, методы исследования и обработки полученных результатов и т.д. В информационный справочник понятий, применяемый в ЕАЭС<sup>4</sup>, не включены определения надлежащей лабораторной практики (Good laboratory practice, GLP), плана доклинических исследований и (или) протокола доклинических исследований.

В положениях п. 4 ст. 11 закона № 61-ФЗ указано, что «доклиническое исследование лекарственного средства для медицинского применения проводится по утвержденному разработчиком лекарственного средства плану с ведением протокола этого исследования и составлением отчета, в котором содержатся результаты этого исследования и заключение о возможности проведения клинического исследования ЛП для медицинского применения».

В ГОСТ Р 56701-2015<sup>5</sup> такие определения, как «план доклинических исследований» и (или) «протокол доклинических исследований», не включены. Однако в ГОСТ 33044-2014<sup>6</sup> в разделе 3.8.1 «План исследования» дается подробное описание процедуры разработки и утверждения плана ДКИ, который должен быть разработан и утвержден до начала исследования. Понятие «протокол доклинического исследования» в данном ГОСТе отсутствует.

Согласно определениям Правил надлежащей лабораторной практики ЕАЭС<sup>7</sup> «план (протокол,

<sup>1</sup> ОФС.1.11.0001 Радиофармацевтические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

<sup>2</sup> Там же.

<sup>3</sup> Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11.08.2020 № 100 «О Фармакопее Евразийского экономического союза».

<sup>4</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

<sup>5</sup> ГОСТ Р 56701-2015 Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств.

<sup>6</sup> ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики.

<sup>7</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

программа) исследования (study plan) (далее – план) – документ, содержащий основные задачи, методологию, процедуры, статистические аспекты, организацию и планирование ресурсов доклинического (неклинического) исследования (включая его этапы и части), а также меры по обеспечению безопасности участвующих в нем систем». Далее по тексту ни протокол, ни программа не упоминаются, однако подробно описана процедура разработки плана ДКИ и его содержание.

Различия в используемой терминологии служат поводом для замечаний в процессе экспертизы документов для получения разрешения на проведение клинических исследований и запросам дополнительной информации. Так, например, заявителем предоставлен план ДКИ, а приложениями к итоговому отчету являются протоколы исследования. Проверяющее лицо делает замечание и в качестве дополнительной информации запрашивает «программу/протокол ДКИ», имея в виду документ, являющийся по своему назначению и содержанию именно планом ДКИ.

Руководство ЕАЭС по доклиническим исследованиям<sup>8</sup> гармонизировано с руководством М3R2 Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)<sup>9</sup>. Использование переводной терминологии может приводить к неоднозначной трактовке одних и тех же понятий при проведении ДКИ в различных исследовательских центрах (лабораториях).

Таким образом, при разработке и гармонизации нормативных документов, регламентирующих ДКИ РФЛП в России, необходимо провести унификацию терминологии, придерживаясь формулировок, принятых в законе № 61-ФЗ.

### **Нормы и правила, регламентирующие доклинические исследования РФЛП в Российской Федерации**

Согласно требованиям закона № 61-ФЗ испытательные центры должны проводить ДКИ лекарственных средств для медицинского применения в соответствии с правилами GLP. Отмечено, что ДКИ проводятся путем

применения научных методов оценок в целях получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного средства. При этом в законе № 61-ФЗ не указаны виды ДКИ и не определены подходы к выбору объема этих исследований.

Проведение ДКИ РФЛП подразумевает одновременную работу с лабораторными животными и открытыми источниками ионизирующего излучения и регулируется правилами радиационной безопасности и обращения с радиоактивными веществами [1]. Исследователям необходимо решить: соблюдение требований каких санитарных правил обязательно при проведении ДКИ РФЛП? Какие нормативные документы являются приоритетными: правила GLP или санитарные правила обеспечения радиационной безопасности?

В случае формального подхода к исполнению требований закона № 61-ФЗ исследования РФЛП, проведенные с соблюдением норм радиационной безопасности и биоэтики, но не в соответствии с правилами GLP, могут быть не признаны уполномоченными органами как ДКИ, выполненные надлежащим образом.

В ходе ДКИ РФЛП должны быть изучены:

- токсикологическая безопасность применения препарата;
- функциональная пригодность (возможность использования РФЛП с конкретной радиодиагностической или терапевтической целью);
- уникальная для РФЛП характеристика – радиационная безопасность применения.

Исследование радиационной безопасности РФЛП необходимо для минимизации рисков возникновения нежелательных реакций, связанных с воздействием ионизирующего излучения. Это исследование включает в себя оценку риска возникновения отсроченного действия ионизирующего излучения на наиболее чувствительные органы и системы организма, а также прогностический расчет поглощенных доз, создаваемых в основных жизненно важных органах, тканях и организме в целом. Недостатки методических указаний по доклиническому изучению общетоксического действия терапевтических РФЛП, проанализированные в публикации [2], касаются также препаратов диагностического назначения.

<sup>8</sup> 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».

<sup>9</sup> ICH M3 (R2) Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. EМА/СРМР/ICH/286/1995. ЕМА; 2009.

В отечественном Руководстве по проведению ДКИ лекарственных средств<sup>10</sup> ни разу по тексту не встречается словосочетание «радиофармацевтический препарат», соответственно, нет описания методических подходов к проведению ДКИ РФЛП.

Научная обоснованность дизайна исследования, единообразия методик сбора и интерпретации данных, достоверность и воспроизводимость полученных результатов имеют определяющее значение при принятии решения о выдаче разрешения на проведение клинических исследований и регистрации ЛП. В своем докладе<sup>11</sup> А.И. Селезнева отметила: «...к одному из неприемлемых рисков ДКИ относится недостаточный или избыточный объем исследований. Использование общепризнанного руководства по ДКИ существенно снижает вероятность возникновения такого риска. Это также необходимо для проведения экспертизы результатов ДКИ...»

Отсутствие специализированных рекомендаций по ДКИ РФЛП вынуждает исследователей искать пути адаптации имеющегося руководства<sup>12</sup>, особенно при изучении безопасности применения РФЛП.

### Методическое регулирование исследований при изучении общетоксического действия РФЛП

Исследования общетоксического действия обязательны для любого ЛП. При этом вопрос обоснованности исследования специфических видов токсичности РФЛП во многом является дискуссионным и не может быть рассмотрен в рамках данной работы.

Основными результатами доклинических токсикологических исследований нового потенциального ЛП являются прогноз его безопасности для человека [3] и получение экспертного заключения о возможности предполагаемых клинических исследований [4]. Ошибки при выборе дизайна для проведения токсикологических исследований РФЛП приводят к выполнению экспериментов, результаты которых не обеспечивают достижения цели. Так, например, исследования субхронической токсичности

терапевтических РФЛП на нерадиоактивном препарате не позволяют оценить вклад излучения радионуклида в биологические эффекты препарата. Исследования кумуляции РФЛП часто носят избыточный характер, являются низкоинформативными и нарушают принципы 3R.

Особенности РФЛП, которые не позволяют при проведении ДКИ использовать рекомендации, применимые для других групп препаратов, представлены в *таблице 1*.

При изучении общетоксического действия РФЛП в соответствии с Руководством<sup>13</sup> определяют острую и хроническую токсичность препарата.

Целью изучения **острой токсичности** является определение переносимых, токсических и летальных доз фармакологически активного вещества и причин наступления гибели животных при однократном введении препарата или при его введении через короткие (не более 6 ч) интервалы времени в течение суток с анализом клинической картины интоксикации<sup>14</sup>.

При исследованиях РФЛП ни для одного из применяемых в медицинской практике радионуклидов в условиях безопасной работы невозможно достичь не только дозировок, обеспечивающих возможность вычисления ЛД<sub>50</sub>, но и достоверно регистрируемых токсических эффектов.

Для РФЛП группы 1 (*табл. 1*) возможно изучение острой токсичности нерадиоактивного раствора реагентов для приготовления РФЛП в увеличивающихся концентрациях. В этом случае изучаемые дозировки определяют по химическому предшественнику. Полученные данные о безопасности набора для приготовления РФЛП ценны, так как эти наборы подлежат обязательной регистрации.

Для РФЛП группы 2 наиболее правильным будет изучение острой токсичности продукта так называемого «холодного синтеза», когда в меченой молекуле радиоактивный изотоп заменен на стабильный. Однако процесс «холодного синтеза» далеко не всегда осуществим. Другим вариантом является изучение готовой лекарственной формы РФЛП после выдержки «на распад»,

<sup>10</sup> Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

<sup>11</sup> Селезнева А.И. Эффективная система контроля качества доклинических исследований как один из ключевых рычагов управления рисками. XXI Всероссийская конференция «Государственное регулирование в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий – ФармМедОбращение 2019». М.; 2019. <https://roszdravnadzor.gov.ru/pages/about/conference/pharmmedcirculation2019>

<sup>12</sup> Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

<sup>13</sup> Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. В кн.: Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. С. 13–24.

<sup>14</sup> Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

**Таблица 1.** Классификация радиофармацевтических препаратов (РФЛП) по способу изготовления

**Table 1.** Radiopharmaceuticals (RPs) by production method

Группа РФЛП <i>RP group</i>	Способ изготовления <i>Production method</i>	Краткая характеристика <i>Brief description</i>
1	Изготавливают из набора для приготовления РФЛП и раствора радионуклида <i>Production using an RP preparation kit and radionuclide solution</i>	Молекулы химического предшественника РФЛП практически не изменяют своих биологических свойств в процессе мечения радионуклидом. В водных растворах такие молекулы химически стабильны <i>Radiolabelling makes practically no changes to the original biological properties of chemical precursor molecules. Such molecules feature chemical stability in aqueous solutions</i>
2	Изготавливают из химических предшественников, которые в ходе синтеза РФЛП претерпевают химическую модификацию <i>Production from chemical precursors, which undergo chemical modification during the RP synthesis</i>	Биологические свойства исходного вещества и меченой молекулы, получаемой в процессе синтеза и обеспечивающей доставку радионуклида к целевым клеткам-мишеням, существенно отличаются. В водных растворах молекулы химического предшественника, как правило, химически не стабильны <i>The starting material and the labelled molecule, which is obtained by synthesis and transports the radionuclide to the cell target, have markedly different biological properties. Usually, chemical precursor molecules are not chemically stable in aqueous solutions</i>
3	Производят в промышленных условиях. РФЛП представляет собой физиологически приемлемый раствор радионуклида с допустимым содержанием изотопного носителя (стабильного изотопа данного элемента или его соединения, химические свойства которых тождественны свойствам радиоактивного) <i>Industrial production resulting in RPs comprising a physiologically acceptable radionuclide solution with a permissible amount of an isotopic carrier (a stable isotope of the element in question or its compound with the same properties as its labelled counterpart)</i>	Как правило, являются препаратами терапевтического назначения, для которых действие испускаемого излучения является определяющим <i>These are usually therapeutic RPs with the emitted radiation effect being their fundamental feature</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

в ходе которого теоретически во всех меченых молекулах радионуклид претерпевает распад до стабильного изотопа в цепочке распада. Это решение также содержит ряд спорных вопросов, самый значимый из которых – образование продуктов радиолиза в неконтролируемых количествах. В данном случае говорить об изученной и подтвержденной безопасности РФЛП можно весьма условно.

Исследования **хронической (субхронической) токсичности** в соответствии с общими требованиями были введены в практику ДКИ РФЛП еще в СССР, когда в разработке преобладали диагностические препараты на основе технеция-99м. Исследования выполняли на модельных растворах лиофилизатов для приготовления РФЛП. При этом подразумевалось, что диагностические дозировки препаратов на основе технеция-99м безопасны для человека. Исследования хронической токсичности наборов для РФЛП с учетом их обязательной регистрации не утратили свою актуальность и в наши дни. Однако в период разработки первых рекомендаций по ДКИ

РФЛП перспектива внедрения метода позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) в широкую клиническую практику не рассматривалась. Препараты для радионуклидной терапии поставлялись в лечебные учреждения в готовой лекарственной форме и представляли собой растворы либо радионуклидов, либо малых комплексов (например, бисфосфонатов). Разработка РФЛП для таргетной радиоиммунотерапии на основе бета- и альфа-излучающих радионуклидов, расширение перечня бета-излучающих радионуклидов оставались перспективными ориентирами даже в начале XXI века [5].

Для получения информации о возможном возникновении и обратимости отсроченных нежелательных реакций, вызываемых, как правило, действием излучения радионуклида, входящего в состав РФЛП, необходимы длительные наблюдения за лабораторными животными. Данное требование не касается диагностических РФЛП на основе ультракороткоживущих радионуклидов.

Методические подходы к изучению радиационной безопасности применения РФЛП во многом схожи с методологией изучения хронической токсичности ЛП других групп. В то же время выполнение исследований РФЛП в полном соответствии с программой изучения хронической токсичности не всегда оправдано и технически выполнимо. Эта программа разработана для оценки токсического действия ЛП, которые применяют многократно в течение определенного времени (курсовое лечение). В отличие от них для диагностических РФЛП, не назначаемых для курсового применения, материальная кумуляция не характерна.

Повторное применение диагностических РФЛП допускается с перерывом как минимум 1 месяц между исследованиями. Для терапевтических РФЛП повторное применение с целью функциональной кумуляции эффекта все активнее внедряется в клиническую практику. Однако с точки зрения клинической фармакологии РФЛП используют не для повторного (многократного) введения, а с повторным назначением.

При проведении ДКИ с ежедневным введением радиоактивных препаратов лабораторным животным, согласно требованиям руководства<sup>15</sup>, искусственно создается материальная кумуляция РФЛП. Поглощенные дозы излучения могут быть причиной развития нежелательных реакций со стороны ряда жизненно важных систем (критических органов). Полученные в результате таких экспериментов данные не будут адекватно отражать возможные риски при дозировании препарата в рекомендованном для клинического применения режиме.

Наиболее подходящим вариантом, с точки зрения авторов, является изучение системной токсичности готовой лекарственной формы РФЛП по протоколу хронической токсичности с однократным введением. Это подразумевает исследование, выполняемое при однократном введении нескольких дозировок РФЛП с последующим динамическим наблюдением за состоянием лабораторных животных по программе исследования хронической токсичности. При этом необходимо использовать два вида лабораторных животных, а путь введения и одна из исследуемых дозировок препарата должны соответствовать планируемому для применения в клинической практике. Целью такого

исследования является определение отсроченных эффектов токсического действия ионизирующего излучения, возникающего при радиоактивном распаде радионуклида, входящего в состав исследуемого РФЛП.

В 2013 г. руководителем Федерального медико-биологического агентства были утверждены методические указания МУ 2.6.1.046-2013 «Доклинические исследования радиофармацевтических препаратов для позитронно-эмиссионной томографии». Однако разработка новых РФЛП на основе ранее не применявшихся в ПЭТ-диагностике радионуклидов с периодом полураспада, превышающим 1 ч, генераторных позитрон-излучающих радионуклидов и лиофилизированных реагентов требует изменения подходов к исследованию их токсичности по сравнению с требованиями МУ 2.6.1.046-2013.

Аллогенные клетки, меченые радионуклидами с периодом полураспада, превышающим 1 ч, для ПЭТ-исследований также следует рассматривать как готовую лекарственную форму РФЛП [6]. Официальные рекомендации по проведению ДКИ подобных РФЛП отсутствуют.

Таким образом, расширение линейки разрабатываемых РФЛП для ПЭТ, совершенствование методов ДКИ и развитие подходов к разработке их дизайна требуют подготовки новых рекомендаций, которые заменят обсуждаемые методические указания.

Формальное применение подхода ЕАЭС<sup>16</sup>, согласно которому под фармакокинетическими исследованиями подразумевается исследование только метаболического профиля и степени связывания ЛП белками крови, может привести к упразднению важного для РФЛП понятия «функциональная пригодность». Возможности использования подхода ЕАЭС при планировании и проведении фармакокинетических ДКИ РФЛП терапевтического назначения рассмотрены в публикации [2].

В руководстве ЕАЭС<sup>17</sup> в разделе «Требования к проведению доклинических исследований, необходимых для обоснования объема проведения поисковых клинических исследований» указано, что «...необходимо представить соответствующие фармакокинетические данные и дозиметрические показатели высоко-радиоактивных веществ (например, веществ

<sup>15</sup> Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

<sup>16</sup> 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».

<sup>17</sup> Там же.

для ПЭТ-визуализации)». Однако отнести РФЛП для ПЭТ (так же, как и не упомянутые РФЛП для однофотонной эмиссионной компьютерной томографии) к высокоактивным веществам можно весьма условно. А вот РФЛП терапевтического назначения, которые, без сомнения, можно отнести к данной категории, не упомянуты вовсе.

Принцип выбора максимальных доз в исследованиях общей токсичности не применим к РФЛП. Согласно п. 36 руководства ЕАЭС<sup>18</sup> при исследовании микродоз предусмотрено исключение из общего подхода к выбору максимальной дозы. В этом случае «...результаты, полученные после однократного введения ЛП, могут быть главным обоснованием проведения исследований с участием человека». Однако в руководстве описано исследование микродоз применительно только к препаратам для ПЭТ, несмотря на то что указанная как микродоза суммарная дозировка  $\leq 100$  мкг характерна для всех РФЛП.

Важно отметить, что решение вопроса интеграции метода микродоз в ДКИ РФЛП лимитировано требованием выполнять эти исследования в соответствии с правилами GLP, которые имеют критически значимые противоречия с нормами радиационной безопасности. Именно поэтому для РФЛП необходимы отдельные руководства.

Проведение гистологических исследований в соответствии с руководством<sup>19</sup> для РФЛП не обосновано. В списке указано более 30 органов, которые необходимо взять для исследования, в том числе варолиева железа, тимус, скелетная мышца, глаз, кожа и т.д. Логичнее проводить гистологическое исследование критических органов и органов, обладающих физиологической гиперфиксацией РФЛП, в противном случае для значительного количества отобранных и исследованных органов будет получен заведомо ожидаемый отрицательный результат.

## Мировая практика регулирования доклинических исследований РФЛП

В США вопросы проведения ДКИ и клинических исследований РФЛП регулирует Комитет по исследованию радиофармацевтических лекарственных средств (Radioactive Drug Research Committee, RDRC) Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA). Одобрение Комитета считается достаточным для проведения тех или иных исследований.

Исторически регуляторная политика FDA в отношении РФЛП, которые не выделялись в отдельный класс ЛП, основывалась на строгом следовании Закону о лицензировании РФЛП и подвергалась довольно жесткой критике [7]. В результате были разработаны рекомендации, регламентирующие ДКИ РФЛП<sup>20</sup>. В марте 2004 г. FDA опубликовало отчет «Проблемы и возможности на критическом пути к новым медицинским продуктам»<sup>21</sup>, в котором медицинская визуализация и биомаркеры визуализации определены как потенциальные инструменты клинической разработки новых лекарственных средств и сокращения сроков разработки. В отчете было отмечено, что наступило подходящее время для пересмотра требований FDA к ДКИ РФЛП, были отмечены уникальные проблемы, касающиеся РФЛП для ПЭТ с короткоживущими радионуклидами, которые потребовали пересмотра и уточнения существующих правил.

Анализ методических подходов FDA к ДКИ безопасности применения терапевтических РФЛП, изложенных в руководстве FDA<sup>22</sup>, приведен в публикации [2]. Целью таких исследований является выявление органов, потенциально уязвимых при проведении диагностических или лечебных процедур с использованием РФЛП для последующего сравнения полученных доз с нормами, установленными Международной комиссией по радиологической защите<sup>23</sup> [8].

<sup>18</sup> 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».

<sup>19</sup> Руководство по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения. Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 21.05.2020 № 10.

<sup>20</sup> Guidance for industry. Developing medical imaging drug and biological products. Part 1: Conducting safety assessments. FDA; 2004.

<sup>21</sup> Challenge and opportunity on the critical path to new medical products. FDA; 2004.

<sup>22</sup> Guidance for industry. Nonclinical evaluation of late radiation toxicity of therapeutic radiopharmaceuticals. FDA; 2011.

<sup>23</sup> Diagnostic reference levels in medical imaging. ICRP Publication 135. *Ann ICRP*. 2017;46(1).

Radiation dose to patients from radiopharmaceuticals – Addendum 3 to ICRP Publication 53. ICRP Publication 106. *Ann ICRP*. 2008;38(1–2).

Guidance for industry. Oncology therapeutic radiopharmaceuticals: nonclinical studies and labeling recommendations. FDA; 2018.

Guidance for industry. Microdose radiopharmaceutical diagnostic drugs: nonclinical study recommendations. FDA; 2018.

Недавние изменения регуляторной политики ДКИ РФЛП в США произошли благодаря обращению FDA к программе консультаций по предварительному применению новых лекарственных средств (Pre-IND). В результате проведение токсикологических исследований разрешено не только в лабораториях, аккредитованных по GLP (Good Laboratory Practice), но и в «не GLP» лабораториях, например университетских кафедрах анатомии или отделениях ветеринарной медицины. Принятое решение позволяет проводить подобные исследования с меньшими финансовыми и материальными затратами [8].

В августе 2019 г. FDA опубликовало финальную редакцию руководства «Терапевтические радиофармпрепараты в онкологии: доклинические исследования и рекомендации по мечению»<sup>24</sup>. В руководстве обсуждается оценка токсичности при системном введении РФЛП, оценка радиационной токсичности и маркировка препарата. Настоящее руководство дополняет действующее руководство 2011 г.<sup>25</sup> и содержит рекомендации по проведению ДКИ при разработке препарата, позволяет обеспечить более последовательный подход к этим исследованиям и маркировке препарата, а также сократить количество ДКИ, не являющихся информативными для РФЛП. Ожидается, что руководство FDA поможет спонсорам в разработке программы соответствующих ДКИ до начала первых клинических испытаний (first-in-human, FIH).

В 2018 г. FDA опубликовало руководство по ДКИ диагностических РФЛП, основанное на концепции микродозы<sup>26</sup>. Рекомендуется до начала первой фазы клинических исследований изучить фармакологические характеристики (*in vivo* и *in vitro*; профилирование рецепторов, мишеней, нормальных тканей; возможности визуализации; дозиметрию излучения). Эти исследования должны предоставить доказательства того, что радиоактивное мечение не приводит к существенному изменению фармакологических характеристик исходного вещества. Необходимо провести пролонгированное (расширенное) изучение токсичности при введении одной дозы препарата на одном

виде животных (обычно грызунам). FDA допускает использование расширенных исследований токсичности в разовых дозах на животных для обоснования клинических исследований при введении одной дозы препарата. Если рекомендовано провести исследование токсичности, спонсор может использовать один вид млекопитающих (обоих полов). Путь введения препарата животным должен соответствовать предполагаемому клиническому пути введения. Не требуется изучение генотоксичности, фармакологической безопасности и токсичности при повторном введении РФЛП<sup>27</sup>.

Для установления пределов безопасности РФЛП в ДКИ необходимо использовать препарат, максимально схожий с препаратом, предназначенным для проведения клинических исследований. До начала фазы III клинических исследований должны быть получены результаты ДКИ фармакокинетики РФЛП. Проводить исследования репродуктивной токсичности нет необходимости, поскольку предупреждение о радиационном риске для плода будет отражено в маркировке. Также не требуется изучение местной переносимости<sup>28</sup>.

ЕМА рекомендует<sup>29</sup> для проведения ДКИ безопасности РФЛП использовать общее руководство ICH M3(R2)<sup>30</sup>. Соответственно этой рекомендации исследование токсичности РФЛП должно проводиться на веществах со стабильным изотопом-аналогом и с обязательным проведением исследований генотоксичности. Это требование вызывает обоснованную критику как со стороны специалистов в области ДКИ РФЛП, так и самого ЕМА, поскольку так называемые «холодные» РФЛП иногда имеют отличающиеся профили «польза – риск»; например для терапевтических РФЛП замена радиоактивного нуклида на стабильный не позволяет оценить вклад радионуклида в потенциальные риски радиационного повреждения системы гемопозеза, органов введения. Потенциальные эффекты генотоксичности РФЛП связаны непосредственно с воздействием ионизирующего излучения, что не может быть определено при изучении «холодных» аналогов.

<sup>24</sup> Guidance for Industry. Oncology therapeutic radiopharmaceuticals: nonclinical studies and labeling recommendations. FDA; 2018.

<sup>25</sup> Guidance for industry. Nonclinical evaluation of late radiation toxicity of therapeutic radiopharmaceuticals. FDA; 2011.

<sup>26</sup> Guidance for industry. Microdose radiopharmaceutical diagnostic drugs: nonclinical study recommendations. FDA; 2018.

<sup>27</sup> Там же.

<sup>28</sup> Там же.

<sup>29</sup> Position paper on non-clinical safety studies to support clinical trials with a single microdose. EMEA/CPMP/SWP/2599/02/Rev1. EMA; 2004.

<sup>30</sup> ICH guideline M3(R2) Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. EMA/CPMP/ICH/286/1995. EMA; 2009.

Устранить этот пробел должно было решение ЕМА о разработке руководства, специально созданного для проведения ДКИ РФЛП<sup>31</sup>. В документе подчеркивается, что необходимость в руководстве по ДКИ РФЛП возникла в связи с отсутствием подробных инструкций. Решение ЕМА определяет риск-ориентированный, целевой подход к программе ДКИ РФЛП и планированию будущих клинических испытаний. В проекте были приняты во внимание различные сценарии разработки, охватывающие высокую вариабельность используемых сегодня РФЛП, включая минимальное изменение в структуре известных РФЛП, и порядок обращения с высокомолекулярными препаратами, масса которых более 100 мкг. В разделе 5.4.2 рекомендаций по терапевтическим РФЛП<sup>32</sup> предложена та же стратегия испытаний, которая описана и для диагностических РФЛП, включающая исследования фармакологии вещества, фармакокинетики (биораспределение, дозиметрия), токсикологии и генотоксичности. Дополнительно указано, что дозиметрическое исследование может быть выполнено на модельной патологии с использованием животных, если это необходимо, чтобы обеспечить адекватное достижение накопления РФЛП в целевом очаге.

Разработка ДКИ на основе руководства ЕМА<sup>33</sup> должна позволить упростить исследования и снизить затраты на внедрение РФЛП в клинику. Согласно законодательству Европейского союза (ЕС) фармакологические исследования, включая исследования визуализации и биораспределения, могут проводиться за пределами лабораторий, аккредитованных по GLP, но для исследований токсичности это невозможно без научного обоснования, при составлении которого необходимо «...рассмотреть потенциальное воздействие несоблюдения (GLP) на надежность полученных данных о безопасности применения тех или иных препаратов». Открытое обсуждение документа было завершено в июне 2019 г., однако документ так и не приобрел статус утвержденного.

В отличие от аналогичных руководств FDA<sup>34</sup>, в руководстве ЕМА не рассматривается радиа-

ционно-индуцированная токсичность, поскольку она охватывается директивами Евроатома (Directive 2013/59/Euratom – Protection against ionising radiation)<sup>35</sup>.

Концепция по пересмотру руководства по РФЛП, основанная на необходимости использовать накопленный опыт, опубликована в июне 2023 г. на официальном сайте ЕМА<sup>36</sup>. Ожидается, что предлагаемое руководство заменит действующий документ ЕМЕА/СНМР/СНМР/СНМР/306970/2007. Было отмечено, что несогласованные интерпретации, недостаточно подробное рассмотрение ряда вопросов требуют пересмотра документа. Кроме того, тексты Европейской фармакопеи, касающиеся РФЛП, претерпели существенные изменения с момента принятия действующего руководства.

В 2014 г. в рамках 17-го Европейского симпозиума по радиофармацевтике и РФЛП (European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals, ESRR'14) Швейцарский центр прикладных исследований человека представил презентацию «Доклиническое тестирование безопасности диагностических и терапевтических радиофармпрепаратов – нормативные требования», в которой были проанализированы требования к доклиническим исследованиям РФЛП в США и ЕС, а также требования Швейцарского агентства по лекарственным средствам (Swissmedic). Swissmedic выпустило методический документ (не имеющий обязательной юридической силы) по ДКИ диагностических и терапевтических радиофармпрепаратов<sup>37</sup>. В настоящее время это один из немногих доступных методических документов о ДКИ безопасности РФЛП.

Согласно документу<sup>38</sup> диагностические РФЛП делятся на три класса.

- Класс 1: химические вещества – носители радиоактивной метки, вводимые на уровнях количества, сами по себе не вызывающие фармакологического действия. Для таких РФЛП достаточно проведение исследований по расчету прогнозных значений доз облучения человека на основе математических

<sup>31</sup> Guideline on the non-clinical requirements for radiopharmaceuticals. EMA/CHMP/SWP/686140/2018. EMA; 2018.

<sup>32</sup> Там же.

<sup>33</sup> Там же.

<sup>34</sup> Guidance for Industry. Oncology therapeutic radiopharmaceuticals: nonclinical studies and labeling recommendations. FDA; 2018. Guidance for industry. Microdose radiopharmaceutical diagnostic drugs: nonclinical study recommendations. FDA; 2018.

<sup>35</sup> Council Directive 2013/59/Euratom of 5 December 2013 laying down basic safety standards for protection against the dangers arising from exposure to ionising radiation, and repealing Directives 89/618/Euratom, 90/641/Euratom, 96/29/Euratom, 97/43/Euratom and 2003/122/Euratom. *Official Journal of the European Union*. 2014;(L13):1–73.

<sup>36</sup> Concept paper on the revision of the guideline on radiopharmaceuticals. EMA/CHMP/QWP/298182/2023. EMA; 2023.

<sup>37</sup> HD-Guidance document. Authorization radiopharmaceutical. Swissmedic; 2015.

<sup>38</sup> Там же.

и (или) физических моделей (т.е. с использованием фантомов).

- Класс 2: химические вещества — носители радиоактивной метки, способные вызывать (вводимым количеством) аллергические типы реакции (к примеру, белки). Для этих РФЛП рекомендуется проведение оценки риска сенсибилизации к агенту.
- Класс 3: химические вещества — носители радиоактивной метки, потенциально способные оказывать собственное фармакологическое действие. Для этих РФЛП необходимо устанавливать минимальную фармакологически активную дозу и минимальную дозу радиации, необходимую для удовлетворительной визуализации, и проводить исследования острой токсичности.

В документе указано, что исследования хронической и репродуктивной токсичности, а также канцерогенности, для диагностических РФЛП обычно не требуются. В свою очередь, для терапевтических РФЛП должны быть разработаны методологии оценки устойчивости комплекса с радионуклидом *in vivo*, биораспределения РФЛП в организме лабораторных животных, потенциальной химической токсичности (в особых случаях исследования мутагенности, канцерогенности и исследования влияния на репродуктивную функцию), радиационного облучения тканей.

Важными преимуществами данного руководства<sup>39</sup> являются внимание к особенностям терапевтических РФЛП (их локальное введение без перераспределения в организме) и к особенностям лекарственных форм некоторых РФЛП, представляющих собой суспензии микро- и макрочастиц, нагруженных радионуклидом.

Необходимость прогностической оценки формируемых поглощенных доз в патологических очагах и здоровых тканях на этапе ДКИ не подвергается сомнению ни одним из авторитетных регуляторных органов [10, 11]. Однако решение о том, к какой из характеристик РФЛП (безопасности или функциональной пригодности) отнести полученную информацию, не является очевидным. И если для РФЛП диагностического назначения величины дозовых нагрузок однозначно характеризуют их безопасность, то для РФЛП терапевтического назначения эти данные являются как характеристиками безопасности, так и позволяют оценить возможность формирования в очаге патологии терапевтических уровней поглощенных доз.

В работе [12] было отмечено, что различия нормативных требований руководств FDA, EMA и Swissmedic по ДКИ РФЛП зачастую основаны не на научных данных, а на политике юрисдикций и могут препятствовать глобальному сотрудничеству, увеличивать расходы и замедлять прогресс. Стремясь преодолеть эти различия, регуляторные органы и международные организации уже начали работу по анализу нормативной базы с целью гармонизации их требований.

Предстоящая работа будет далеко не легкой даже только в рамках стран ЕС, отдельные государства-члены которого сохраняют значительное влияние на законодательство, что приводит к неоднородности нормативно-правовой базы в области радиофармации. Например, многие законодательные акты ЕС, касающиеся производства лекарственных средств, представляют собой директивы, которые должны быть интегрированы в национальное законодательство каждой страны — участницы ЕС. Этот процесс допускает возможность интерпретации нормативной документации, регламентирующей ДКИ РФЛП, для ее интеграции в уже имеющиеся локальные руководства, что может привести к различиям требований в разных странах. Хочется надеяться, что благодаря постоянному сотрудничеству реформа и гармонизация нормативной базы станут реальностью и ускорят доступ к самым современным научно обоснованным методам лечения пациентов.

В настоящее время продолжается обсуждение направлений совершенствования существующих в мировой практике регуляторных правил ДКИ РФЛП [13]. Так, в разделе «Дебаты» журнала *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* в 2019 г. опубликован анализ текущего состояния в области регулирования ДКИ и клинических исследований РФЛП [9]. Авторы констатируют, что регуляторные органы как в США, так и в Европе признали необходимость более конкретного подхода к РФЛП на этапе перехода от доклинической разработки к клиническому применению. Недавно был выпущен или находится в стадии разработки ряд документов, принятие которых приведет к более гармонизированному подходу к упрощению требований к доклиническим данным по безопасности новых РФЛП.

Одной из целей МАГАТЭ как наиболее авторитетной организации в области мирного использования ядерных технологий в глобальном масштабе является разработка руководств и рекомендаций, касающихся различных

<sup>39</sup> HD-Guidance document. Authorization radiopharmaceutical. Swissmedic; 2015.

аспектов жизненного цикла новых РФЛП<sup>40</sup>. В 2023 г. МАГАТЭ в качестве экспертного мнения было опубликовано руководство по ДКИ РФЛП<sup>41</sup> как общий обзор требований к проведению таких исследований. Дано описание основных принципов и базовых протоколов ДКИ для оценки безопасности, эффективности и качества исследований новых РФЛП. Рекомендовано определять объем и методы исследований в соответствии с требованиями регуляторных органов каждой конкретной страны.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка и внедрение современных методических руководств в практику проведения доклинических исследований радиофармацевтических препаратов, несомненно, будут способствовать снижению возможных рисков их медицинского применения, поскольку эта

группа лекарственных средств фактически выпадает из рамок нормативно-правового поля в России и ЕАЭС.

Для этого требуется гармонизация нормативных документов и терминологии в рамках ЕАЭС, разработка соответствующих требований для радиофармацевтических препаратов как диагностического, так и терапевтического назначения с учетом правил обеспечения радиационной безопасности.

При разработке руководств по доклиническим исследованиям радиофармацевтических препаратов, несомненно, будет полезно использовать в качестве ориентиров руководства FDA, ЕМА и МАГАТЭ. Необходимо рассмотреть вопросы о перечне обязательных и об исключении неинформативных исследований из требований к данной группе препаратов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кодина ГЕ, Малышева АО. Основные проблемы обеспечения качества радиофармацевтических лекарственных препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(4):216–30. Kodina GE, Malysheva AO. The main issues of quality assurance of radiopharmaceuticals. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(4):216–30 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-216-230>
2. Клементьева ОЕ, Лунёв АС, Лунёва КА. Методические подходы к доклиническому изучению общетоксического действия терапевтических радиофармацевтических препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(4):255–62. Klementyeva OE, Lunev AS, Lunyova KA. Methodological approaches to preclinical evaluation of general toxicity of therapeutic radiopharmaceuticals. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(4):255–62 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-4-255-262>
3. Гуськова ТА. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований. *Токсикологический вестник*. 2010;(5):2–5. Guskova TA. Preclinical toxicological study of drugs as a guarantee of their safe clinical investigations. *Toxicological Review*. 2010;(5):2–5 (In Russ.). EDN: [TQUMYX](https://doi.org/10.30895/1991-2919-2010-5-2-5)
4. Верстакова ОЛ. Проблемы проведения доклинической экспертизы безопасности лекарственных средств. *Токсикологический вестник*. 2010;(5):6–11. Verstakova OL. Issues emerging from conducting preclinical expertise of medical products safety. *Toxicological Review*. 2010;(5):6–11 (In Russ.). EDN: [TQUMZH](https://doi.org/10.30895/1991-2919-2010-5-6-11)
5. Цыб А, Гарбузов П, Давыдов Г, Скворцов В. Современное состояние и перспективы применения радионуклидов в медицине. *Бюллетень по атомной энергии*. 2003;(8):39–42. Tsyb A, Garbuzov P, Davydov G, Skvortsov V. Current state and prospects for the use of radionuclides in medicine. *Atomic Energy Bulletin*. 2003;(8):39–42 (In Russ.).
6. Sato N, Wu H, Asiedu KO, Szajek LP, Griffiths GL, Choyke PL. <sup>89</sup>Zr-oxine complex PET cell imaging in monitoring cell-based therapies. *Radiology*. 2015;275(2):490–500. <https://doi.org/10.1148/radiol.15142849>
7. Harapanhalli RS. Food and Drug Administration requirements for testing and approval of new radiopharmaceuticals. *Semin Nucl Med*. 2010;40(5):364–84. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2010.05.002>
8. Yonekura Y, Mattsson S, Flux G, Bolch WE, Dauer LT, Fisher DR, et al. ICRP publication 140: radiological protection in therapy with radiopharmaceuticals. *Ann ICRP*. 2019;48(1):5–95. <https://doi.org/10.1177/0146645319838665>
9. Schwarz SW, Decristoforo C. US and EU radiopharmaceutical diagnostic and therapeutic nonclinical study requirements for clinical trials authorizations and marketing authorizations. *EJNMMI Radiopharm Chem*. 2019;4(1):10. <https://doi.org/10.1186/s41181-019-0059-2>
10. Guerra Liberal FD, Tavares AA, Tavares JM. Comparative analysis of 11 different radioisotopes for palliative treatment of bone metastases by computational methods. *Med Phys*. 2014;41(11):114101. <https://doi.org/10.1118/1.4897240>
11. Semenenko VA, Stewart RD. A fast Monte Carlo algorithm to simulate the spectrum of DNA damages formed by ionizing radiation. *Radiat Res*. 2004;161(4):451–7. <https://doi.org/10.1667/rr3140>
12. Schwarz SW, Decristoforo C, Goodbody AE, Singhal N, Saliba S, Ruddock P, et al. Harmonization of United States, European Union and Canadian first-in-human regulatory requirements for radiopharmaceuticals – is this possible? *J Nucl Med*. 2018;jnumed.118.209460. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.209460>
13. Sandeep S, Ashish B, Rakesh KS. Radiopharmaceuticals regulations on bioavailability and bioequivalence: present status and future requirements. *Mod Appl Bioequiv Availab*. 2017;1(4):555567. <https://doi.org/10.19080/MABB.2017.01.555567>

<sup>40</sup> Good practice for introducing radiopharmaceuticals for clinical use. International Atomic Energy Agency IAEA-TECDOC. No. 1782. Vienna: IAEA; 2016.

<sup>41</sup> Guidance for preclinical studies with radiopharmaceuticals. IAEA Radioisotopes and Radiopharmaceuticals Series No. 8 IAEA L22-01558.

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *О.Е. Клементьева* – анализ и систематизация данных литературы, написание текста рукописи; *А.В. Смирнова* – систематизация данных литературы, переработка и редактирование текста рукописи; *Н.Ю. Кульбачевская* и *Е.Ю. Григорьева* – критический пересмотр содержания рукописи; *Ю.С. Лагодзинская* – оформление и редактирование итогового варианта рукописи; *Т.Г. Геворкян* – утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Olga E. Klementyeva* analysed and systematised literature data and drafted the manuscript. *Anna V. Smirnova* systematised literature data, revised and edited the manuscript. *Natalia Yu. Kulbachevskaya* and *Elena Yu. Grigorieva* critically reviewed the manuscript. *Yulia S. Lagodzinskaya* formatted and edited the final version of the manuscript. *Tigran G. Gevorkyan* approved the final version of the manuscript for publication.

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Клементьева Ольга Евгеньевна**, канд. биол. наук / **Olga E. Klementyeva**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6604-0860>

**Смирнова Анна Вячеславна**, канд. биол. наук / **Anna V. Smirnova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0386-9732>

**Кульбачевская Наталия Юрьевна**, канд. мед. наук / **Natalia Yu. Kulbachevskaya**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4214-3475>

**Григорьева Елена Юрьевна**, д-р биол. наук / **Elena Yu. Grigorieva**, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7726-7991>

**Лагодзинская Юлия Сергеевна** / **Yulia S. Lagodzinskaya**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6260-0763>

**Геворкян Тигран Гагикович**, д-р мед. наук / **Tigran G. Gevorkyan**, Dr. Sci. (Med.)

Поступила 05.12.2023

После доработки 07.02.2024

Принята к публикации 12.02.2024

Received 5 December 2023

Revised 7 February 2024

Accepted 12 February 2024



Н.С. Ильинский   
М.А. Тюнин   
С.В. Чепур   
В.А. Пугач   
В.А. Мясников 

## Практические аспекты функциональной оценки токсических поражений периферической нервной системы в доклинических исследованиях на грызунах: обзор

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, ул. Лесопарковая, д. 4, Санкт-Петербург, 195043, Российская Федерация*

✉ *Ильинский Никита Сергеевич; [gniiivm\\_7@mil.ru](mailto:gniiivm_7@mil.ru)*

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** В практике доклинических исследований безопасности фармакологически активных веществ стандартные процедуры оценки нейротоксичности в основном нацелены на диагностику расстройств высшей нервной деятельности и поведения. Однако именно структуры периферической нервной системы ввиду большей уязвимости представляют собой доступную мишень, что обуславливает высокую распространенность нейротоксичных побочных эффектов лекарственных средств. Указанные обстоятельства определяют актуальность уточнения методических подходов к оценке токсических поражений периферической нервной системы.

**ЦЕЛЬ.** Анализ современного методического уровня клинко-функциональных тестов для оценки токсического действия фармакологически активных веществ на структуры периферической нервной системы и формулирование практических рекомендаций по их применению при проведении доклинических исследований на грызунах.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Оптимальной тест-системой для доклинических исследований фармакологически активных веществ считаются грызуны, однако используя этих животных невозможно воспроизвести весь объем неврологического осмотра, применяемого для выявления клинических эквивалентов нейротоксичности. В работе представлено описание системного подхода к использованию доступных диагностических тестов для повышения транслируемости данных. Дана краткая характеристика неврологического дефицита, вызванного побочными действиями лекарственных средств у людей, и описаны основные токсиндромы, которые также могут быть выявлены у животных. На основании обзора литературы и собственного опыта в соответствующих разделах представлены практические рекомендации по выполнению основных тестов, позволяющих исследовать силу и тонус мышц, состояние физиологических рефлексов, координацию движений и разные виды чувствительности у грызунов. Приведены краткие сведения о возможностях электрофизиологической диагностики искомых поражений. В качестве минимального перечня методик первичного скрининга нейротоксических побочных эффектов рекомендованы следующие тесты: оценка позы животного в покое и при ходьбе «Сужающаяся дорожка», «Подтягивание на горизонтальной перекладине», шкала отведения пальцев, «Тест отдергивания хвоста», рефлекс Преяера.

**ВЫВОДЫ.** Анализ результатов комплексной оценки неврологического дефицита в экспериментах на грызунах рекомендовано проводить клинически релевантным способом, то есть с позиций топической диагностики и общности звеньев патологического процесса. Целесообразно выполнять верификацию патологического процесса на уровне периферической нервной системы при помощи комплекса электрофизиологических методик.

**Ключевые слова:** нейротоксичность; лабораторные животные; фармакологическая безопасность; клиничко-функциональные тесты; полинейропатия; миастенический синдром; тест сужающаяся дорожка; тест подтягивание на горизонтальной перекладине; шкала отведения пальцев; тест отдергивания хвоста; рефлекс Прейера; грызуны; исследования на грызунах

**Для цитирования:** Ильинский Н.С., Тюнин М.А., Чепур С.В., Пугач В.А., Мясников В.А. Практические аспекты функциональной оценки токсических поражений периферической нервной системы в доклинических исследованиях на грызунах: обзор. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):265–282. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-265-282>

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Nikita S. Ilinskii ✉   
Mikhail A. Tyunin   
Sergey V. Chepur   
Viktoria A. Pugach   
Vadim A. Myasnikov 

## Practical Aspects of Assessing Toxic Lesions of the Peripheral Nervous System in Preclinical Studies in Rodents: A Review

State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine,  
4 Lesoparkovaya St., St Petersburg 195043, Russian Federation

✉ **Nikita S. Ilinskii**; [gniivm\\_7@mil.ru](mailto:gniivm_7@mil.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** In the current practice of preclinical safety studies of pharmacologically active substances, standard neurotoxicity assessment procedures are mainly aimed at diagnosing higher nervous activity and behavioural disorders. However, it is the structures of the peripheral nervous system that are particularly susceptible to drug-induced neurotoxicity, which renders these structures an easy target and leads to a high incidence of neurotoxic side effects. These circumstances dictate the importance of refining methodological approaches to the assessment of toxic injury in the peripheral nervous system.

**AIM.** The study aimed to analyse the current methodological level of clinical and functional tests for assessing the toxic effects of pharmacologically active substances on the structures of the peripheral nervous system, as well as to formulate practical recommendations for using these tests in preclinical studies in rodents.

**DISCUSSION.** Rodents are considered the optimal test system for preclinical studies of pharmacologically active substances, but it is impossible to reproduce the entire neurological examination that is conducted to identify clinical equivalents of neurotoxicity in humans using these animals. This article presents a systematic approach to using available diagnostic tests to increase the translatability of data. The article briefly describes the neurological deficits due to adverse drug reactions in humans, as well as the main toxidromes that can also occur in animals. Based on a literature review and experience, the authors provide practical recommendations for performing basic tests to study the strength and tone of muscles, the state of physiological reflexes, the coordination of movements, and various types of sensitivities in rodents. The article provides a brief overview of the diagnostic utility of electrophysiological testing for identifying toxic damage to the peripheral nervous system. The following tests are recommended as a minimum list of primary screening techniques for detecting neurotoxic side effects in study animals: a resting posture assessment, the beam walking test, the horizontal bar test, the digit abduction score assay, the tail flick test, and the Preyer reflex test.

**CONCLUSIONS.** The results of a comprehensive assessment of neurological deficits in rodent experiments should be analysed from a clinically relevant perspective—that is, with a focus on topical diagnosis and common pathological process components. It is advisable to verify the pathological process at the level of the peripheral nervous system using a set of electrophysiological techniques.

**Keywords:** neurotoxicity; laboratory animals; safety pharmacology; clinical functional testing; polyneuropathy; myasthenic syndrome; beam walking test; horizontal bar test; digit abduction score; tail flick test; Preyer's reflex; rodents; rodent studies

**For citation:** Ilinskii N.S., Tyunin M.A., Chepur S.V., Pugach V.A., Myasnikov V.A. Practical aspects of assessing toxic lesions of the peripheral nervous system in preclinical studies in rodents: a review. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):265–282. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-265-282>

**Funding.** The study was performed without external funding.

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Нейротоксичность – способность химических веществ, действуя на организм немеханическим путем, вызывать напрямую или опосредованно нарушение структуры и (или) функций нервной системы [1]. Порог чувствительности компонентов нервной системы к функциональному или структурному воздействию нейротоксичных веществ в ряде случаев существенно ниже, чем у других органов и систем организма. Вместе с тем наличие гематоэнцефалического, гематоликворного, а также периневрального барьеров налагает токсикодинамический запрет на реализацию нейротоксических эффектов множества соединений, для которых свойства нейротоксичности были прослежены в культурах клеток и тканей.

Необходимость скрининговой оценки нейротоксичности фармакологически активных веществ (ФАВ) в рамках доклинических исследований продиктована рядом российских и международных руководящих документов<sup>1</sup> и составляет значительную часть всего объема исследований безопасности. В современной практике доклинические исследования безопасности ФАВ в первую очередь включают оценку расстройств интегральных функций нервной системы и не учитывают важность выявления изолированных нейротоксических эффектов на уровне центральной (ЦНС) или периферической (ПНС) нервной системы [2, 3]. Вместе с тем в ряде случаев именно структуры ПНС подвержены изолированным, иногда отсроченным по мере формирования патологического процесса повреждениям в результате токсических эффектов ФАВ [4, 5]. В ПНС к основным мишеням нейротоксического действия ФАВ относят тела двигательных и чувствительных нейронов,

нейриты и их миелиновую оболочку, структуры эндо- и периневрия периферических нервов, а также нервно-мышечные синапсы (НМС). Следствием нейротоксичности ФАВ на уровне ПНС являются блоки проведения с разрушением дуг соматических или вегетативных рефлексов, диагностируемых в том числе по функциональным или органическим повреждениям скелетных мышц [6].

На данный момент нейротоксические эффекты на уровне ПНС описаны для широкого перечня лекарственных средств, в том числе из групп антибактериальных, противовирусных, антиаритмических, противоопухолевых препаратов, кортикостероидов, витаминов и статинов [6–10]. Согласно опубликованным данным, выявление нежелательных эффектов со стороны нервной системы обуславливает до 30% случаев прекращения исследований лекарственных препаратов на этапах клинических испытаний, что указывает на несовершенство методических подходов к оценке нейротоксичности при проведении доклинических исследований [11, 12]. В настоящее время большинство доклинических исследований выполняют на грызунах, которые с учетом анатомо-физиологических особенностей строения нервной системы и относительно низкой стоимости исследований признаны оптимальными тест-объектами для скрининговой оценки нейротоксичности<sup>2</sup> [13–15].

Доклинические исследования нейротропных ФАВ сопряжены с рядом проблем, связанных с недостаточным пониманием биологических основ заболеваний и неудовлетворительными прогностическими возможностями экспериментальных моделей<sup>3</sup>. По данной причине результаты оценки неврологического дефицита у грызунов зачастую представляют собой значения

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

Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. ICH S7A. Note for safety pharmacology studies for human pharmaceuticals. CPMP/ICH/539/00. EMEA; 2001.

<sup>2</sup> OECD guideline for the testing of chemicals. Test No. 424: Neurotoxicity study in rodents. <https://doi.org/10.1787/9789264071025-en>

<sup>3</sup> OECD guideline for the testing of chemicals. Test No. 426: Developmental neurotoxicity study. <https://doi.org/10.1787/9789264067394-en>

суррогатных характеристик, которые сложно интерпретировать и затруднительно транслировать в клиническую практику [13, 16, 17]. Следует признать, что присутствует вариативность выполнения широко известных диагностических методик, способная существенно повлиять на конечный результат оценки, а подробные стандартизированные методические руководства отсутствуют. Рядом авторов признана необходимость повышения точности доклинической оценки новых ФАВ в контексте определения нейротоксичности [12, 17].

Токсические поражения ПНС представляют собой сочетание различных патологических процессов. Их прогрессия может быть реализована в виде проявлений расстройств движений (мышечная слабость или утомляемость), чувствительности (онемение, парестезии, гипералгезия/аллодиния, боль) и вегетативных функций, а также их сочетанием. Такое разнообразие нарушений вызвано тем, что моторные, сенсорные и вегетативные нейроны обладают различной чувствительностью к повреждающему воздействию ксенобиотиков [18]. Специалистам в области доклинических исследований важно помнить, что поражения ПНС не ограничены часто ожидаемой кумулятивной токсичностью. Нередко нейротоксические эффекты манифестируют мультимодальными проявлениями и возникают в поздние сроки, а также с дополнительным усилением не прямых отдаленных эффектов [17]. Эти механизмы в значительной степени зависят от токсических свойств ФАВ, а формы их проявления – от дозы и длительности введения.

Поэтому полноценная и всесторонняя оценка нарушений функций нервной системы в эксперименте должна иметь целью выявление пораженных структур по аналогии с принципами топической диагностики, используемой в клинической практике. В то же время у лабораторных животных невозможно полностью воспроизвести весь объем неврологического осмотра, необходимый для выявления клинических эквивалентов патологии человека, что подчеркивает необходимость системного подхода к использованию доступных диагностических тестов для повышения транслируемости данных. Именно этим определена актуальность настоящей работы.

Цель работы – анализ современного методического уровня клинико-функциональных тестов

для оценки токсического действия фармакологически активных веществ на структуры периферической нервной системы и формулирование практических рекомендаций по их применению при проведении доклинических исследований на грызунах.

Поиск источников литературы осуществляли в базах данных PubMed, Google Scholar, eLIBRARY.RU по ключевым словам: нейротоксичность, грызуны, фармакологическая безопасность, клинико-функциональные тесты, полинейропатия, миастенический синдром. Глубина поиска источников – 30 лет.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### Токсические поражения периферической нервной системы

Рассматривая основные типы неврологического дефицита (табл. 1), традиционно оцениваемого в клинической практике, следует отметить, что в случаях токсических поражений ПНС наиболее показательны периферические расстройства двигательных и вегетативных функций, а также чувствительности. Расстройства сознания и других высших функций мозга в меньшей степени свойственны нейротоксикантам периферического действия либо возникают при их воздействии в крайне высоких дозах<sup>4</sup> [6].

Наиболее часто лекарственные токсические поражения ПНС манифестируют в форме симметричных дистальных аксональных (реже демиелинизирующих) полинейропатий (ПНП), скорость прогрессирования которых зависит от механизма действия, дозы и длительности приема ФАВ [10]. Признаки очаговых поражений нервов выявляют гораздо реже. К особенностям токсических ПНП относят вовлечение всех трех типов волокон, что сопровождается комбинированной сенсорно-моторно-вегетативной симптоматикой, однако выраженность этих компонентов может значительно отличаться для разных веществ [19]. Преимущественное поражение моторных (двигательных) волокон ПНС манифестирует проявлениями нарастающего пареза вплоть до тетрапареза, а избирательное поражение толстых миелинизированных чувствительных волокон опосредует расстройства глубокой чувствительности<sup>5</sup>. Для аксонопатий характерна быстрая прогрессия денервационной атрофии мышц, что предположительно связывают с прекращением аксоплазматического тока<sup>6</sup>. Демиелинизирующим ПНП менее свойственна

<sup>4</sup> Яхно НН, Штульман ДР. Болезни нервной системы: руководство для врачей. М.: Медицина; 2001.

<sup>5</sup> Там же.

<sup>6</sup> Там же.

Таблица 1. Основные типы неврологического дефицита, оцениваемые в клинической практике

Table 1. Main types of neurological deficits measured in clinical practice

Типы неврологического дефицита <i>Neurological deficit types</i>	Подтипы неврологического дефицита (расстройств) <i>Neurological deficit (disorder) subtypes</i>	Синдромы/симптомы <i>Syndromes/symptoms</i>
Расстройства чувствительности <i>Sensory disorders</i>	Общая чувствительность <i>General senses</i>	Простая чувствительность: 1) поверхностная – болевая, температурная, тактильная 2) глубокая – вибрационная, мышечно-суставная <i>Simple sensation:</i> 1) <i>superficial: pain, temperature, touch</i> 2) <i>deep: vibration, muscle and joint position (proprioception)</i>
	Специальная чувствительность <i>Special senses</i>	Сложная чувствительность: локализация, стереогноз, дискриминационная чувствительность <i>Complex sensation: touch localisation, stereognosis, two-point discrimination</i> Зрительная, слуховая, вкусовая <i>Vision, hearing, taste</i>
Расстройства движений <i>Movement disorders</i>	Непроизвольные движения <i>Involuntary movements</i>	Рефлексы: поверхностные, глубокие, патологические <i>Reflexes: superficial, deep, pathological</i> Синкинезии: физиологические, патологические <i>Synkineses: physiological, pathological</i>
	Произвольные движения <i>Voluntary movements</i>	Снижение мышечной силы, патологическая утомляемость <i>Muscle weakness, pathological fatigue</i>
	Координация движений <i>Motor coordination</i>	Статическая: стояния, ходьбы, асинергии <i>Static coordination: astasia, abasia, dyssynergia</i> Динамическая: интенционный тремор, дисметрия, нистагм <i>Dynamic coordination: intention tremor, dysmetria, nystagmus</i>
	Экстрапирамидные расстройства <i>Extrapyramidal symptoms</i>	Гипокинезия: гипомимия, мышечная ригидность, тремор покоя <i>Hypokinesia: hypomimia, rigidity, rest tremor</i> Гиперкинезы: хорей, атетоз, гемибаллизм и др. <i>Hyperkinesia: chorea, athetosis, haemiballismus, etc.</i>
Расстройства сознания <i>Disorders of consciousness</i>	Качественные <i>Qualitative disorders</i>	Делирий, онейроид, аменция <i>Delirium, oneiroid syndrome, amentia</i>
	Количественные <i>Quantitative disorders</i>	Оглушение, сопор, кома I–IV ст. <i>Somnolentia, sopor, coma (grade I–IV)</i>
Расстройства высших мозговых (когнитивных) функций <i>Disorders of higher brain functions (cognitive disorders)</i>	Агнозии <i>Agnosia</i>	Астереогноз, зрительная, слуховая <i>Astereognosis, visual agnosia, auditory agnosia</i>
	Апраксии <i>Apraxia</i>	Идеомоторная, глазодвигательная, концептуальная <i>Ideomotor apraxia, oculomotor apraxia, conceptual apraxia</i>
	Афазии <i>Aphasia</i>	Моторная, сенсорная, эфферентная <i>Motor aphasia, receptive aphasia, kinetic aphasia</i>
Расстройства вегетативных функций <i>Vegetative function disorders</i>		Зрачковые реакции <i>Pupillary responses</i>
		Ортостатическая гипотензия, вариабельность ритма сердца, глазосердечный рефлекс <i>Orthostatic hypotension, heart rate variability, oculocardiac reflex</i>
		Дермографизм, потоотделение, терморегуляция <i>Dermatographia, sweating, thermoregulation</i>
		Нарушения функций тазовых органов <i>Pelvic organ dysfunction</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

атрофия мышц, которая возникает лишь при длительном течении патологического процесса [19]. Чувствительность аксонов к токсическим поражениям прямо пропорциональна их длине, поэтому признаки ПНП в первую очередь выявляют в дистальных участках самых протяженных нервов<sup>7</sup>. Значительно реже подвержены поражению черепные нервы: зрительный, глазодвигательный, лицевой, преддверно-улитковый [20, 21]. В силу реализации компенсационных механизмов симптомы токсических поражений нервных сплетений редки, за исключением случаев локального воздействия местных анестетиков. Описано влияние на вегетативную систему всего нескольких лекарственных средств, в частности алкалоидов барвинка и статинов [10].

К основным клиническим проявлениям токсических ПНП относят онемение, парестезии, нейропатическую боль, снижение мышечного тонуса и вялые (периферические) парезы (мышечную слабость), которые распределены дистально по типу «перчаток и носков» [10]. Существует мнение, что при токсических ПНП нарушения чувствительности преобладают над двигательными расстройствами, однако такое действие свойственно далеко не всем веществам [19, 22]. На фоне снижения глубокой чувствительности (в основном за счет мышечно-суставной и вибрационной) возникает сенситивная атаксия, снижаются или исчезают физиологические рефлексы. При выявлении симптоматики в проксимальных отделах конечностей следует предположить вовлечение спинномозговых корешков, описываемое термином «полирадикулоневропатия».

В случае токсических поражений пре- или постсинаптических структур НМС говорят о миастеническом синдроме (МС). При этом ведущим симптомом считают мышечную слабость (так же, как и при ПНП) или патологическую мышечную утомляемость, которые принято рассматривать как парез не неврогенной природы [19, 22]. К признакам, отличающим МС от ПНП, относят сохранность физиологических рефлексов, отсутствие расстройств чувствительности, нарушений функций тазовых органов и амиотрофий [18, 19].

В аспекте дифференциальной диагностики обращают внимание на важность оценки мышечной силы, физиологических рефлексов и тонуса мышц при подозрении на поражение ПНС. Однако такие методики недостаточно широко внедрены в рутинную экспериментальную практику, также нередко допускают ошибочное

толкование указанных терминов. Вместе с этим следует понимать, что выраженные сенсорные и (или) моторные нарушения при ПНП или МС способны изменять поведенческие реакции животных в таких тестах, как открытое поле, реакции избегания, лабиринт Морриса и др., которые предназначены в первую очередь для исследования неврологических расстройств центрального генеза. В подобных случаях исследователями могут быть неверно интерпретированы результаты тестирования, если не выполнена оценка состояния функций на уровне ПНС.

Токсические расстройства движений разделяют на: 1) снижение силы или утомляемость (слабость); 2) тремор; 3) нарушения координации; 4) спазмы, миоклонию или аномальные движения (гипокинезию, гиперкинезы, патологические синкинезии) [23]. Обычно при токсических поражениях ПНС в клинической практике выявляют снижение силы или патологическую мышечную утомляемость (слабость). По нашему мнению, именно методы оценки расстройств движений и чувствительности в экспериментах на грызунах в силу объективности методического аппарата наиболее приемлемы для изучения нейротоксичности ФАВ и последующей трансляции данных в клиническую практику.

Характеристика нейротоксических эффектов некоторых лекарственных средств различных групп представлена в *таблице 2*.

### Оценка токсических поражений периферической нервной системы

В современной экспериментальной практике принято, что при оценке наиболее опасных побочных эффектов ФАВ должны быть реализованы максимальные интенсивность и глубина тестирования. Стратегии тестирования должны обеспечивать баланс между глубиной и широтой исследования ради получения основных исходных данных для оценки безопасности ФАВ. В случае необходимости должны быть проведены отдельные целевые исследования (например, электрофизиологические, морфологические, исследования *in vitro* / *ex vivo*) по уточнению механизмов вызываемых ФАВ нейротоксических эффектов [17, 23]. Такой многоуровневый подход к тестированию может быть основан на качественном первичном неврологическом осмотре, который позволил бы адекватно и быстро выявить основные виды нарушений у животных [17, 24]. С учетом этого ниже представлен анализ методологических особенностей выполнения

<sup>7</sup> Яхно НН, Штульман ДР. Болезни нервной системы: руководство для врачей. М.: Медицина; 2001.

Таблица 2. Некоторые лекарственные средства, вызывающие токсические поражения периферической нервной системы

Table 2. Some medicines that cause toxic lesions of the peripheral nervous system

Лекарственные средства <i>Medicines</i>	Токсиндром <i>Toxidrome</i>	Механизм нейротоксического действия <i>Neurotoxicity mechanism</i>	Источник <i>Source</i>
Фторхинолоны Макролиды Аминогликозиды <i>Fluoroquinolones Macrolides Aminoglycosides</i>	Миастенический синдром, ухудшение течения миастении <i>Myasthenic syndrome (MS), deterioration of MS</i>	Прямые нарушения нервно-мышечной передачи на пре- и постсинаптическом уровне <i>Direct impairment of neuromuscular transmission at pre- and postsynaptic levels</i>	[6, 10]
Статины <i>Statins</i>	Миастенический синдром, ухудшение течения миастении, сенсорная полинейропатия <i>MS, deterioration of MS, sensory polyneuropathy (PNP)</i>	Сдвиг поляризации Т-лимфоцитов, миопатия, повреждение митохондрий нейронов <i>Shift in T-cell polarisation, myopathy, neuronal mitochondrial damage</i>	[6, 7, 10]
Прокаинамид Препараты лития <i>Procainamide Lithium products</i>	Миастенический синдром, ухудшение течения миастении <i>MS, deterioration of MS</i>	Уменьшение образования и выделения ацетилхолина в нервных окончаниях, уменьшение числа постсинаптических Н-холинорецепторов <i>Reduction of acetylcholine production in and release from nerve endings, decrease in the number of post-synaptic N-cholinergic receptors</i>	[6]
Амиодарон <i>Amiodarone</i>	Моторно-сенсорная полинейропатия <i>Sensorimotor PNP</i>	Демиелинизация, потеря крупных аксонов с лизосомальными включениями; окислительный стресс и нарушение лизосомальной деградации <i>Demyelination, loss of large axons with lysosomal inclusions; oxidative stress and impaired lysosomal degradation</i>	[7, 8, 10]
Таксаны <i>Taxanes</i>	Преимущественно сенсорная, в тяжелых случаях сенсорно-моторная полинейропатия <i>Predominantly sensory PNP, with sensorimotor PNP in severe cases</i>	Нарушение метаболического кальциевого сигналинга, полимеризации тубулина при аксональном транспорте <i>Interference into metabolic calcium signaling, disruption of tubulin depolymerisation in axonal transport</i>	[7, 9]
Алкалоиды барвинка <i>Vinca alkaloids</i>	Преимущественно сенсорная полинейропатия <i>Predominantly sensory PNP</i>	Клеточная и аксональная транспортная дисфункция, опосредованная микротрубочками <i>Dysfunction of cellular and axonal transport mediated by microtubules</i>	[7–9]
Бортезомиб Талидомид <i>Bortezomib Thalidomide</i>	Сенсорная полинейропатия тонких волокон, связанная со жгучей болью <i>Small-fibre sensory PNP accompanied by burning pain</i>	Митохондриальная дисфункция в аксонах; высвобождение кальция митохондриями, приводящее к активации апоптотического каскада <i>Mitochondrial dysfunction in axons, mitochondrial calcium release leading to apoptotic cascade activation</i>	[7–10]

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

некоторых клинико-функциональных тестов (КФТ) для выявления расстройств движений и чувствительности у грызунов.

К общим рекомендациям при проведении КФТ следует отнести необходимость предварительного отбора и обучения животных. Важно формировать у животных устойчивый навык выполнения методики при однотипных условиях. Не следует обогащать среду обитания в домашней клетке, поскольку регулярное перемещение животных по разным предметам может создать эффект «тренированности» и исказить результаты тестирования [24, 25]. Желательно, чтобы неврологический осмотр одновременно выполняли два сотрудника в строгом соответствии со стандартной операционной процедурой. Несмотря

на простоту выполнения КФТ, межисследовательская вариабельность оценки результатов представляет проблему при динамической регистрации неврологического дефицита и должна быть сведена к минимуму [24].

Следует избегать использования большого числа тестов, которые измеряют один и тот же параметр, например мелкую моторику передних конечностей или мышечную силу, поскольку каждый тест может увеличить выраженность стресса у животных. С целью уменьшения влияния систематических ошибок необходимо организовывать исследование в соответствии с устоявшимися принципами доказательной медицины (рандомизация, ослепление, контроль хода эксперимента, обоснованная

статистическая обработка результатов), которые подробно описаны в работах [16, 17].

Использование порядковых (ранговых) оценочных шкал представляет своего рода проблему, поскольку двукратное увеличение баллов не означает, что состояние одного животного в два раза лучше другого, поскольку отдельные части соответствующих тестов измеряют разные функции, но итоговые показатели интегрируют в единую оценку [23]. На наш взгляд, следует избегать совокупной балльной характеристики неврологического дефицита путем суммирования различных признаков, заменив это комплексным анализом полученных данных с позиций топической диагностики и общности звеньев патологического процесса.

Большинство из упомянутых в статье КФТ апробированы на моделях поражений ЦНС (черепно-мозговые травмы, острые нарушения мозгового кровообращения, болезнь Паркинсона и др.), однако все они также могут быть применены для оценки токсических поражений ПНС. При этом важным практическим аспектом остается необходимость внимательной совокупной интерпретации всех данных неврологического осмотра и нейрофизиологических исследований с целью топической диагностики.

### Оценка силы мышц

Известно множество КФТ для оценки силы мышц у грызунов (в основном мышей и крыс), каждый из которых достаточен для установления факта двигательных расстройств, однако не позволяет достоверно определить уровень поражения ЦНС и (или) ПНС. Наиболее широкое распространение в доклинических исследованиях получил тест «Удержание на перевернутой горизонтальной сетке», который модифицируют расположением сетки над емкостью с водой, а результат оценивают по времени удержания. Этот тест вместе с тем не позволяет объективно оценить силу мышц, что может быть реализовано в тесте «Подтягивание на горизонтальной перекладине» [26–28]. Внимательный анализ результатов выполнения теста позволяет выявить у животного целый ряд функциональных расстройств:

- 1) неспособность схватывать перекладину (то есть снижение или полное угнетение хватательного рефлекса);
- 2) неспособность выполнить сложный двигательный акт «подтягивание, схватывание тазовой конечностью, движение в сторону

по перекладине», то есть тест позволяет выявить апраксию;

3) в случаях, когда животное длительно зависает на перекладине (порядка 15–20 с) без выполнения подтягивания, с наибольшей вероятностью имеет место:

- нарушение навыка, но не снижение силы;
- снижение силы мышц проксимальных отделов грудных конечностей с сохранением силы мышц дистальных отделов;

4) в случаях сохранности позы животного в покое отрицательный тест подтягивания способен указать на слабость мышц дистальных отделов конечностей.

Совокупный анализ результатов теста и осмотра животного в покое пригоден для исследования функций центрального двигательного контроля, состояния хватательного рефлекса, силы разных групп мышц грудных конечностей и, в меньшей степени, для оценки тонуса мышц, что находит подтверждение в иностранной литературе [26, 29].

В экспериментах на мышах установлено, что способность к захвату перекладины обратно пропорциональна ее диаметру, а оптимальным следует считать диаметр 2 мм [26]. Такая же закономерность прослежена для крыс, в работе с которыми следует использовать перекладину диаметром 2–4 мм. С другой стороны, использование более толстых перекладин усложняет для животного выполнение теста, но повышает его чувствительность. Важным практическим моментом следует считать необходимость правильного расположения животного на перекладине в исходном положении виса на вытянутых (полностью выпрямленных) передних (грудных) конечностях. В противном случае высока вероятность захвата перекладины задней (тазовой) конечностью, что учитывают как ложноположительный результат.

С целью количественной оценки силы мышц грудных и тазовых конечностей часто используют аппаратное измерение силы схватывания. Показано, что вертикальное расположение прибора и животного следует считать оптимальным вариантом теста по причине обеспечения наилучшего уравнивания воздействующих сил и повышенной мотивацией животных к удерживанию штанги устройства (рис. 1). Доказательством этому служили меньшая вариабельность значений измерений и большая чувствительность к изменениям силы по сравнению с традиционным способом выполнения методики. Для анализа данных теста

предпочтительнее использовать показатель абсолютной силы захвата, нежели нормализованной по массе тела, поскольку в последнем случае часто регистрируют противоречивые результаты. Тест пригоден для динамического наблюдения и позволяет оценивать функциональное состояние мышц на фоне развития МС [30].

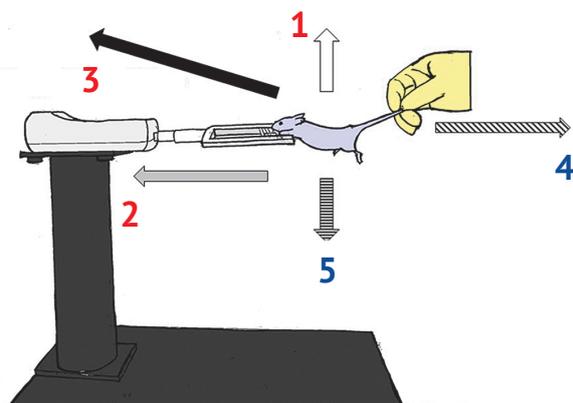
Наиболее достоверным инструментом для исследования силы мышц у всех видов грызунов считают метод электронейромиостимуляционной механографии. Используя различные протоколы стимуляции, регистрируют параметры отклика мышц на электрическое раздражение в виде единичного супрамаксимального стимула или высокочастотной тетанизации и получают расчетные параметры, характеризующие силу мышцы и ее функциональное состояние (рис. 2) [31, 32]. Данный метод позволяет топически определять уровень поражения структур ПНС путем сравнения силы сокращения мышц в ответ на стимуляцию либо двигательного нерва на разных уровнях, либо напрямую мышц, а также дифференцировать парезы, вызванные развитием ПНП и (или) МС. Однако этот метод достаточно сложен, требует специального оборудования, общей анестезии и соответствующей квалификации сотрудников, а само исследование трудоемко в связи с необходимостью подбора оптимальных и однотипных условий.

### Оценка координации движений

В соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств»<sup>8</sup> для оценки координации движений у грызунов в качестве основного теста рекомендована методика «Ротарод». Данная методика позволяет выявить у всех видов грызунов нарушения, причинами которых могут быть патологические процессы на уровне мозжечка, слабость мышц конечностей вследствие ПНП, патологическая мышечная утомляемость при МС, грубые расстройства глубокой и (или) поверхностной чувствительности. Тест позволяет различить центральные и периферические поражения нервной системы. Считают, что животные с центральными (мозжечковыми) нарушениями координации падают на старте или вскоре после начала теста, в то время как у тех, кто смог удерживать равновесие на стержне более 1–2 мин, тест скорее отражает выносливость или указывает на мышечную слабость (патологическую утомляемость), а не дискоординацию движений как таковую [26]. При этом модификация теста со ступенчатым увеличением скорости вращения стержня не повышает информативности, а лишь укорачивает время на его проведение [29]. Важным условием объективности данного метода признано первичное фенотипирование и предварительное обучение животных. По нашим данным 20–30% белых беспородных крыс

a

- 1 – Напряжение мышц для сопротивления силе тяжести / *Muscle force to resist gravity*
- 2 – Мышечная сила для сопротивления напряжению, создаваемому экспериментатором / *Muscle force to resist the tension generated by an inspector*
- 3 – Комбинированная мышечная сила / *Composite muscle force*
- 4 – Напряжение, создаваемое экспериментатором / *Tension generated by an inspector*
- 5 – Сила тяжести / *Gravity*



b

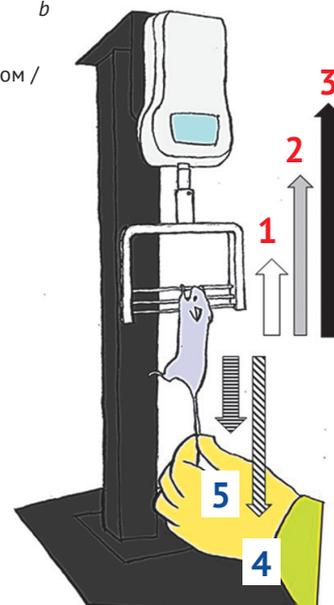


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

**Рис. 1.** Распределение воздействующих на животное сил при выполнении теста «Сила схватывания» (адаптировано из [30]): a – обычный тест; b – модифицированный тест

**Fig. 1.** Distribution of forces acting on the animal in the forelimb grip strength test (adapted from [30]): a, conventional test; b, modified test

<sup>8</sup> Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

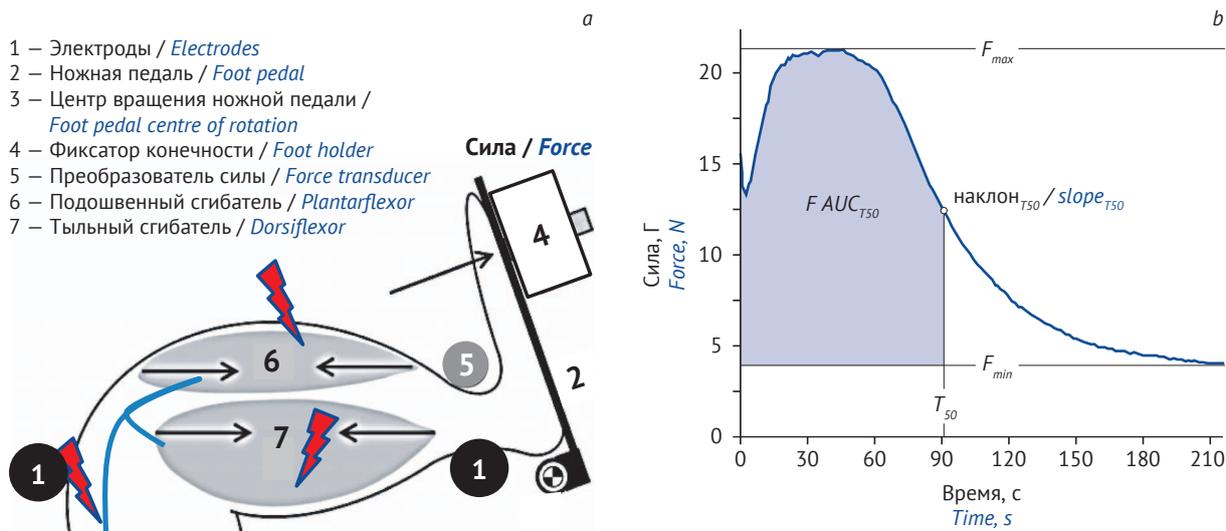


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

**Рис. 2.** Исследование силы мышечных сокращений в ответ на электростимуляцию (адаптировано из [31, 32]). а – принципиальная схема устройства; б – типичный график утомления мышцы. Регистрируемые параметры: максимальное усилие ( $F_{max}$ ), минимальное усилие ( $F_{min}$ ), время полуутомления ( $T_{50}$ ), наклон кривой в точке  $T_{50}$  и индекс утомления мышечной силы ( $F AUC_{T50}$ )

**Fig. 2.** Investigation of the strength of muscle contractions in response to electric nerve stimulation (adapted from [31, 32]). а, schematic diagram of the apparatus; б, typical muscle fatigue envelope. Recorded parameters: maximum force ( $F_{max}$ ), minimum force ( $F_{min}$ ), half-fatigue time ( $T_{50}$ ), slope at  $T_{50}$  ( $slope_{T50}$ ), fatigable muscle force index ( $F AUC_{T50}$ )

проявляют отказ от ходьбы по стержню и падают на подстилающий материал, другие же могут цепляться за стержень и вращаться вместе с ним, а не падать. Таких особей, несомненно, следует исключать из выборки, а с целью устранения захватывания стержня его стоит обернуть материалом, за который животные не могли бы ухватиться (например, грубой резиной). Для качественного обучения животным обычно необходимо не менее 9 тренировочных тестов, выполненных в течение 3 последовательных дней. Важно учитывать массу тела животных при формировании групп и сравнении полученных результатов, поскольку более тяжелые особи выполняют тест хуже.

В комплексе с предыдущей методикой часто используют тест «Сужающаяся дорожка», который предназначен для оценки моторного дефицита тазовых конечностей. Дополнительно при помощи бокового зеркала проводят визуальную оценку походки животного [24]. Этот тест требует минимального оборудования, применим ко всем видам грызунов и может быть проведен быстро, учитывая, что одна пробежка не должна превышать 60 с [29].

Для оценки координации движений у грызунов предложены специализированные шкалы. D.M. Basso и соавт. была разработана крайне подробная 21-балльная оценочная шкала Basso-Beattie-Bresnahan для крыс и 9-балльная

модификация Basso Mouse Scale для мышей. Эти методики ранжируют целый ряд нарушений движений у грызунов, а именно: объем движений в суставах, позицию и положение конечностей, координацию и синхронность движения грудных и тазовых конечностей, способность стабильно удерживать положение тела, характер распределения веса животного. Для использования шкал необходимо проводить исследование двумя сотрудниками с использованием установки «Открытое поле». К недостаткам указанных методик относят необходимость длительного обучения персонала, трудоемкость, высокую вероятность ошибок детекции вследствие субъективной визуальной оценки нарушений локомоторной активности у животных, что не позволяет достоверно оценить степень выраженности неврологического дефицита, если эксперимент проводят несколько исследователей [24].

Детальное исследование двигательной активности у всех видов грызунов с оценкой их координации и походки, в том числе при необходимости динамического наблюдения, позволяют выполнять современные программно-аппаратные комплексы: CatWalk XT (Noldus Information Technology, Нидерланды), DigiGait (Mouse Specifics Inc, США), MotoRater (TSE Systems Inc, Германия). Специализированная компьютерная программа комплекса CatWalk XT обрабатывает видеозапись передвижения

животного в установке, автоматически распознает следы, определяя степень нажима на поверхность в каждой точке пространства, на основании чего дает развернутую характеристику параметров двигательной активности. Схожим потенциалом в отношении исследований походки у грызунов обладает система TreadScan (Clever Sys Inc., США). Основным недостатком этой системы является невозможность оценить степень нажима конечности животного на опору, что не позволяет всесторонне охарактеризовать тяжесть неврологического дефицита [33].

### Оценка тонуса мышц и физиологических рефлексов

Для оценки тонуса мышц у всех видов грызунов наиболее объективным методом считают механографию, совмещенную с электромиографией. Однако этот метод достаточно сложен и редко используется в практике доклинических исследований [34].

В проведенном нами исследовании была доказана высокая информативность адаптированной шкалы отведения пальцев в качестве метода оценки состояния физиологического двигательного рефлекса у крыс при моделировании генерализованной токсической полинейромиопатии [35]. Ранее K.R. Aoki в оригинальном исследовании с помощью данного теста оценивал выраженность неврологических нарушений у мышей при имитации падения с высоты на фоне развития местного миорелаксантного эффекта при введении препарата на основе ботулинического нейротоксина [36]. В последующем данный тест был применен с аналогичной целью у крыс (рис. 3) [37]. Нами было показано, что тестирование при помощи данной шкалы отражает динамику нарастания пареза на фоне системного введения блокаторов нейрональных натриевых каналов в широком диапазоне доз. Причем раннюю реакцию в виде первоначального разведения пальцев стопы на несколько секунд с последующим прижатием 1 или 2 пальцев друг к другу, по нашему мнению, следует рассматривать как эквивалент клинического признака «снижение физиологических рефлексов» (гипорефлексия).

Японскими учеными предложено оценивать состояние глубоких сухожильных рефлексов у крыс путем воспроизведения методики исследования ахиллова рефлекса у человека, используя вместо неврологического молоточка карандаш [38]. Данный подход имеет высокую клиническую релевантность, однако требует применения общей анестезии у животных, что может оказывать влияние на неврологический статус

и определяет потребность в дополнительных исследованиях.

### Оценка расстройств чувствительности

Токсические поражения в виде ПНП у грызунов манифестируют и в виде расстройств различных видов чувствительности (поверхностной, глубокой, интерорецептивной, специальной) [24]. Большинство тестов доступны к выполнению у всех видов грызунов.

#### Оценка поверхностной чувствительности.

При исследовании болевой чувствительности у лабораторных животных обычно оценивают перцептуальный и эмоциональный компоненты ноцицепции. Перцептуальный компонент (собственно ощущение боли) возникает вследствие возбуждения механо/хемонотицепторов. Оценку перцептуального компонента проводят при действии механических, термических и химических стимулов [39, 40].

Механические болевые стимулы используют в следующих тестах: механическая компрессия конечности (тест Рэндалла–Селитто) и дозированное механическое раздражение основания хвоста крыс с помощью зажима (метод Гаффнера). Широко используют тест Рэндалла–Селитто, в котором аппаратным способом оказывают давление на конечность животного до появления у него поведенческих реакций, после чего считывают величину давления при помощи специальной шкалы [40]. Эти методы достаточно просты и могут быть выполнены без использования дорогостоящего оборудования, однако они обладают низкой информативностью и обеспечивают регистрацию лишь выраженных расстройств чувствительности. Воздействие при помощи электронного эстезиометра фон Фрея позволяет более точно объективизировать нарушения чувствительности (гипалгезию, гипералгезию и аллодинию), но при условии неоднократного фонового обследования и определения референтного интервала для конкретной выборки животных [41].

Термические болевые раздражения используют в тестах «Горячая пластина», «Горячая/холодная пластина», «Тест отдергивания хвоста». Кроме этого, существует аппаратный плантарный тест (по методу Харгривза), позволяющий оценивать ноцицептивный порог при воздействии теплового стимула. Особенностью этого теста служит то, что животные имеют возможность свободного передвижения в зоне исследования [42]. Использование более простых подходов (например, исследование реакции



Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

**Рис. 3.** Сравнение паттернов отведения пальцев стоп у мышей и крыс, оцениваемых с помощью шкалы отведения пальцев (адаптировано по [37]). а – норма (0 баллов); б – 2 балла; с – 4 балла

**Fig. 3.** Comparison of toe abduction patterns in mice and rats, evaluated using the digit abduction score (adapted from [37]). a, norm (0 points); b, 2 points; c, 4 points

животного в ответ на опускание хвоста в воду различной температуры) не рекомендовано из-за низкой повторяемости результатов вследствие невозможности проведения эксперимента в одинаковых условиях.

В качестве химических болевых стимулов обычно используют интраплантарное введение формалина, капсаицина или каррагинана [40, 43]. Однако такой подход может значительно изменить течение основного патологического процесса и исказить картину токсического поражения, вызываемого тестируемым ФАВ.

Оценка реакции на температурные раздражители (холод, тепло) часто сопряжена с определением болевой чувствительности, что позволяет провести комплексное исследование поверхностной чувствительности при смешанном термоалгическом воздействии. Существуют подходы к преимущественной оценке температурной чувствительности, в том числе при помощи теста с тепловым градиентом. Тест позволяет определить температурные предпочтения и порог теплового комфорта у лабораторных животных, а также выявить возникновение тепловой аллодинии и гипералгезии [40]. Формирование холодной аллодинии у животных можно определить, помимо использования теста «Холодовая пластина», в тесте испарения ацетона после его нанесения на кожу стопы животного. Однако воспроизводимость данного теста сомнительна ввиду необходимости визуальной оценки полученных результатов, которые, как правило, неоднозначны у животных разного возраста и пола [44].

Вместе с оценкой болевой чувствительности часто проводят исследование тактильной

чувствительности. Преимущественно тактильную чувствительность можно оценить мануально при помощи калиброванных монофиламентов фон Фрея, а также автоматическим методом с использованием динамического подошвенного анестезиометра. Оба метода основаны на механической стимуляции вентральной поверхности кистей и стоп животного. Кроме этого, существуют различные калибры монофиламентов фон Фрея, предназначенные для проведения исследований на конкретных областях тела животного (стопа, кисть, губа, щека и др.) [39]. Следует отметить, что интерпретация полученных результатов затруднена вследствие того, что, по сути, оценивают только одну реакцию животного в виде отдергивания конечности.

**Оценка глубокой чувствительности.** Проприорецептивную (глубокую) чувствительность в основном определяют в виде мышечно-суставного чувства и чувства давления/веса. Существуют специализированные системы измерения приложенного давления (Pressure application measurement, P.A.M.), позволяющие провести количественную оценку порога боли при изучении гиперчувствительности суставов у грызунов [45]. Системы P.A.M. представляют собой достаточно редкое оборудование, которое используют в основном при экспериментальном моделировании у грызунов остеоартритов различной этиологии.

**Оценка интерорецептивной чувствительности.** Для исследования острой висцеральной и соматически глубокой боли наиболее распространен тест с внутрибрюшинным введе-

нием 0,6% уксусной кислоты (тест «Уксусные корчи»). Болевую реакцию («корчи») оценивают по характерному поведению животных: количеству сокращений/расслаблений мышц брюшной стенки (собственно «корчи»), вытягиванию тазовых конечностей, прогибанию спины [46]. По нашему опыту применения данного метода для сравнительной оценки обезболивающих свойств нестероидных противовоспалительных препаратов он весьма субъективен и требует четкой дифференцировки хорошо видимых тонических и спастических компонентов реакции, выраженность которых тяжело оценить. Эти обстоятельства исключили данный метод из применяемой батареи тестов. В некоторых исследованиях для оценки интерорецептивной чувствительности у грызунов используют модели с введением в мочевого пузыря раствора скипидара или оливкового масла. Ряд авторов полагает, что с позиции биоэтических принципов 3R эксперименты по изучению выраженности острой висцеральной боли противоречат правилам гуманного обращения с лабораторными животными [39].

**Оценка специальной чувствительности.** Зрительная чувствительность может быть оценена по выраженности оптомоторной реакции. Так, например, аппаратный комплекс PhenoSys qOMR, представляющий собой вращающийся цилиндр с визуальной стимуляцией, позволяет оценить остроту зрения и контрастную чувствительность [47].

Вкусовую чувствительность оценивают посредством густометрии, в некоторых случаях с использованием специально разработанных приборов – густометров. Густометры дозируют животным небольшие объемы жидкостей, что позволяет исследовать немедленные поведенческие реакции в ответ на воздействие различными вкусовыми стимулами. Также используют и другие, более простые подходы – различные мануальные и аппаратные вариации теста на предпочтение жидкости определенного вкуса [48].

Слуховую чувствительность можно исследовать визуально по рефлексу Преяера, произвольное движение ушных раковин в ответ на внезапный резкий звук) и различными аппаратными способами (в том числе измерение отоакустической эмиссии), а также при комплексной оценке акустической стартл-реакции [49]. Нами накоплен опыт применения для этих целей чрескожной регистрации слуховых стволовых потенциалов.

Обонятельную чувствительность определяют посредством специальных приборов – ольфактометров, которые помимо оценки активности обонятельных сенсорных нейронов и обонятельных луковиц позволяют также оценить когнитивные способности животных [50].

Таким образом, подходы к оценке специальной чувствительности у грызунов довольно сложные, при этом во многих случаях существует потребность в использовании дорогостоящих программно-аппаратных комплексов, что позволяет достичь сходимости результатов, полученных различными группами исследователей или в разных условиях проведения экспериментов. Тем не менее большую часть экспериментальных исследований проводят с использованием тестов для оценки поверхностной чувствительности, при которых выполняют преимущественно визуальную и субъективную оценку состояния животных. Следует признать, что используемый методический аппарат направлен в основном на выявление грубых и, в некоторых случаях, уже необратимых изменений чувствительности, в то время как возможности объективно регистрировать легкие сенсорные расстройства часто отсутствуют.

### Электромиография

В целях уточнения локализации и выраженности токсических эффектов ФАВ на уровне ПНС целесообразно использовать комплексное электромиографическое (ЭМГ) исследование [19, 35, 38]. С помощью ЭМГ могут быть получены ответы на следующие важные вопросы о характере поражения ПНС [19, 51, 52].

1. Какова природа блока проведения: аксональная или демиелинизирующая? В клинической практике эта информация составляет одну из основных целей исследования, поскольку от этого в значительной степени зависят подходы к лечению и прогнозу течения заболеваний. Обычно аксональные процессы затрагивают чувствительные волокна в большей степени, чем двигательные, тогда как равное вовлечение характерно для большинства демиелинизирующих процессов.
2. Какова топика нарушений: очаговая или генерализованная, нарушения симметричные или асимметричные? Для абсолютного большинства токсических поражений ПНС характерны генерализованные симметричные процессы, более выраженные в дистальных отделах длинных нервов.
3. Насколько выражено поражение? Отсутствие реакции на стимул может свидетельствовать

о полной блокаде проводимости или передачи нервного импульса. При заболеваниях ПНС электрофизиологическая картина далеко не всегда коррелирует с тяжестью клинических признаков, однако для токсических поражений свойственна такая взаимосвязь [35].

4. Существует ли субклиническая невропатия? На фоне применения потенциально нейротоксичных препаратов результаты направленного ЭМГ-обследования могут использоваться при подборе дозы, не вызывающей значимого поражения ПНС.

5. Каков прогноз и обратимы ли изменения? Как при демиелинизирующих, так и при аксональных ПНП степень потери аксонов служит ориентиром для прогноза.

6. Какие структуры ПНС поражены? Результаты ЭМГ позволяют дифференцировать ПНП от МС или других патологических процессов (поражение передних рогов спинного мозга, радикулопатия, миопатия), топически определить уровень поражения (корешок, средняя или дистальная часть нервов) и оценить степень денервационного процесса в пораженных мышцах [52].

К основным электрофизиологическим маркерам токсических поражений ПНС могут быть отнесены следующие признаки [35, 52]:

- поражение всех типов волокон (моторных и сенсорных);
- высокая скорость изменения показателей;
- нарастание резидуальной латентности М-ответов;
- сочетание признаков ПНП и МС;
- сочетание признаков демиелинизации и аксонального поражения.

Объем нейрофизиологических исследований, рекомендованный зарубежными регуляторными документами, включает исследование проводимости двигательных нервов при помощи электронейромиографии и чувствительных нервов при помощи соматосенсорных вызванных потенциалов<sup>9</sup>. Данный протокол не включает выполнение оценки нервно-мышечной передачи при помощи ритмической стимуляции (декремент-тест, проба с тетанизацией) несмотря на то, что именно НМС наиболее подвержен воздействиям ксенобиотиков. Исследование нервно-мышечной передачи должно быть рекомендовано для нейрофизиологического исследования при оценке токсических поражений ПНС, поскольку значительное число ФАВ реализуют свои побочные эффекты на уровне синапса [8, 10].

Инструментарий электрофизиологических методов исследования не исчерпан указанными методиками и включает значительное число отдельных тестов, совокупный анализ результатов которых позволяет достаточно точно установить локализацию поражений нервно-мышечного пути на основании количественной оценки основных критериев, указанных в *таблице 3*. Для большинства приведенных критериев у человека определены референтные интервалы, но для лабораторных животных эти данные отсутствуют, в связи с чем актуальной задачей следует признать накопление таких сведений с целью их дальнейшего внедрения в практику доклинических исследований.

К несомненному преимуществу применения ЭМГ в эксперименте следует отнести возможность его выполнения с помощью оборудования, используемого в клинической практике по схожим протоколам. Для качественного электрофизиологического тестирования у всех видов грызунов необходимо применение анестезии ввиду болезненности и для обездвиживания при проведении исследовательской процедуры. С этой целью пригоден комбинированный препарат на основе тилетамина и золазепам (рекомендуемая доза для крыс 25 мг/кг внутривенно), поскольку он не оказывает значимого влияния на регистрируемые параметры, коммерчески доступен и не требует применения оборудования для ингаляционного наркоза<sup>10</sup>. На начальном этапе тестирования целесообразно проводить исследование длинного нерва в дистальном сегменте (*n. tibialis*), поэтому мы рекомендуем выполнять ЭМГ икроножной мышцы по стандартной методике «мышца–сухожилие» при помощи монополярных игольчатых электродов. В ходе выполнения исследования необходимо поддерживать общую температуру тела животных, так как гипотермия приводит к ухудшению показателей нервно-мышечной передачи, в частности, может быть выявлен ложный декремент. Важно учитывать достаточно высокую распространенность поражений ПНС у интактных белых беспородных крыс. По нашим данным ~10% животных имеют признаки МС (инкремент или декремент), что диктует необходимость предварительного фенотипирования и выбраковки таких животных до начала основного эксперимента. Более подробное описание методологии и основных электрофизиологических паттернов токсических поражений ПНС в зависимости от механизмов

<sup>9</sup> Guidelines for neurotoxicity risk assessment. EPA/630/R-95/001F. EPA; 1998.

Health effects test guidelines OPPTS 870.6850 Peripheral nerve function. EPA 712-C-98-241. EPA; 1998.

<sup>10</sup> Guidelines for neurotoxicity risk assessment. EPA/630/R-95/001F. EPA; 1998.

Таблица 3. Основные электрофизиологические признаки поражений периферической нервной системы

Table 3. Main electrophysiological signs of peripheral nervous system damage

Форма поражения периферической нервной системы <i>Form of peripheral nervous system damage</i>	Электромиография <i>Electromyography</i>		Ритмическая стимуляция <i>Repetitive nerve stimulation</i>
	Моторная <i>Motor</i>	Сенсорная <i>Sensory</i>	
Аксональная полинейропатия <i>Axonal polyneuropathy</i>	Снижение амплитуды или повышение силы стимула, полифазия М-ответов <i>Decreased amplitude or increased strength of the stimulus, polyphasic compound muscle action potentials (CMAPs)</i>	Снижение амплитуды сенсорных потенциалов вплоть до отсутствия <i>Decreased or absent amplitude of sensory nerve action potentials (SNAPs)</i>	Обычно без патологических изменений <i>Usually without pathological changes</i>
Демиелинизирующая полинейропатия <i>Demyelinating polyneuropathy</i>	Снижение скорости распространения волны; увеличение латентности М-ответов <i>Decreased motor nerve conduction velocity, increased CMAP latency</i>	Незначительное снижение амплитуды сенсорных потенциалов; снижение скорости распространения волны <i>Slightly decreased SNAP amplitude, decreased sensory nerve conduction velocity</i>	Обычно без патологических изменений <i>Usually without pathological changes</i>
Миастения <i>Myasthenia gravis</i>			Декремент амплитуды (площади) М-ответов выраженностью более 10% <i>CMAP amplitude (area) decrement of more than 10%</i>
Миастенический синдром <i>Myasthenic syndrome</i>	Без патологических изменений <i>No pathological changes</i>		Декремент, декремент-инкремент или инкремент амплитуды (площади) М-ответов <i>CMAP amplitude (area) decrement, decrement-increment, or increment</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

действия ФАВ представляет собой обширную задачу и выходит за рамки настоящей работы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре освещены основные методические подходы к оценке нейротоксических эффектов на уровне ПНС при проведении доклинических исследований безопасности лекарственных препаратов на грызунах. Очевидно, что современный спектр методик позволяет наиболее эффективно и точно оценивать у грызунов расстройства движений, однако трансляция данных и сопоставление выявленных в эксперименте нарушений с аналогичным течением заболеваний, наблюдаемым в клинической практике, до настоящего времени затруднительны. В этом случае с целью топической локализации процесса целесообразно выполнять электрофизиологические исследования, направленные на верификацию патологического процесса на уровне отдельных структур ПНС.

Применение комплексной батареи КФТ, включающей все описанные в настоящей работе методики,

безусловно, невозможно ввиду крайне высокой трудоемкости. В каждом конкретном случае следует подбирать свою комбинацию методов, основанных данными о механизмах фармакологического (токсического) действия тестируемого лекарственного средства или результатами неврологического осмотра при выполнении предварительных исследований. С целью первичного скрининга нейротоксических побочных эффектов нами рекомендовано применение следующего минимального информативного перечня методик, который обладает оптимальным соотношением трудоемкости и чувствительности: оценка позы животного в покое и при ходьбе по «Сужающейся дорожке», «Подтягивание на горизонтальной перекладине», шкала отведения пальцев, «Тест отдергивания хвоста», рефлекс Прейера.

Детальное описание каждой из упомянутых методик может служить темой отдельной публикации, в то время как анализ всей совокупности полученных данных в каждом случае представляет собой нетривиальную задачу. Следует заключить, что экспериментальная оценка

нейротоксичности ФАВ на уровне ПНС требует от исследователя крайне внимательного и методически выверенного отношения, а интерпретация полученных данных должна быть

выполнена в соответствии с общепринятыми принципами неврологической семиотики, нацеленной на дифференциацию клинико-нозологических вариантов течения патологий.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Куценко СА. *Основы токсикологии: научно-методическое издание*. СПб: Фолиант; 2004. Kutsenko SA *Fundamentals of toxicology: a scientific and methodological publication*. St Petersburg: Foliant; 2004 (In Russ.). EDN: [QKMWIB](https://doi.org/10.30895/2312-7821-2020-8-3-151-159)
2. Крышень КЛ, Мошков АЕ, Демяновский МН, Ковалева МА. Экспериментальное исследование фармакологической безопасности лекарственных средств, применяемых для купирования лихорадочного синдрома в детском возрасте. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2020;8(3):151–9. Kryshen KL, Moshkov AE, Demyanovskiy MN, Kovaleva MA. Safety pharmacology study of medicines used for febrile syndrome management in children. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2020;8(3):151–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2020-8-3-151-159>
3. Han KS, Woo DH. Classification of advanced methods for evaluating neurotoxicity. *Mol Cell Toxicol*. 2021;17(4):377–83. <https://doi.org/10.1007/s13273-021-00161-6>
4. Slater C. Diverse aspects of vulnerability at the neuromuscular junction. *Brain*. 2012;135(4):997–8. <https://doi.org/10.1093/brain/aww057>
5. Stubbs EB Jr. Targeting the blood-nerve barrier for the management of immune-mediated peripheral neuropathies. *Exp Neurol*. 2020;331:113385. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113385>
6. Sheikh S, Alvi U, Soliven B, Rezanian K. Drugs that induce or cause deterioration of myasthenia gravis: an update. *J Clin Med*. 2021;10(7):1537. <https://doi.org/10.3390/jcm10071537>
7. Jones MR, Urits I, Wolf J, Corrigan D, Colburn L, Peterson E, et al. Drug-induced peripheral neuropathy: a narrative review. *Curr Clin Pharmacol*. 2020;15(1):38–48. <https://doi.org/10.2174/1574884714666190121154813>
8. Misra UK, Kalita J. Toxic neuropathies. *Neurol India*. 2009;57(6):697–705. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.59463>
9. Pellacani C, Eleftheriou G. Neurotoxicity of antineoplastic drugs: mechanisms, susceptibility, and neuroprotective strategies. *Adv Med Sci*. 2020;65(2):265–85. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2020.04.001>
10. Grisold W, Carozzi VA. Toxicity in peripheral nerves: an overview. *Toxics*. 2021;9(9):218. <https://doi.org/10.3390/toxics9090218>
11. Cook D, Brown D, Alexander R, March R, Morgan P, Satterthwaite M, et al. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(6):419–31. <https://doi.org/10.1038/nrd4309>
12. Chi LH, Burrows AD, Anderson RL. Can preclinical drug development help to predict adverse events in clinical trials? *Drug Discov Today*. 2022;27(1):257–68. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.08.010>
13. Masjosthusmann S, Barenys M, El-Gamal M, Geerts L, Geirosa L, Gorreja A, et al. Literature review and appraisal on alternative neurotoxicity testing methods. *EFSA Supporting Publications*. 2018;15(4):1410E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.en-1410>
14. Chinn GA, Pearn ML, Vutskits L, Mintz CD, Loepke AW, Lee JJ et al. Standards for preclinical research and publications in developmental anaesthetic neurotoxicity: expert opinion statement from the SmartTots preclinical working group. *Br J Anaesth*. 2020;124(5):585–93. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2020.01.011>
15. Shih HP, Zhang X, Aronov AM. Drug discovery effectiveness from the standpoint of therapeutic mechanisms and indications. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;17(1):19–33. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.194>
16. Александров ИВ, Егорова ЕИ, Васина ЕЮ, Новиков ВК, Матыко ПГ, Галагудза ММ. Экспериментальные исследования на животных в эпоху трансляционной медицины. Какими им быть? *Трансляционная медицина*. 2017;4(2):52–70. Aleksandrov IV, Egorova EI, Vasina EYu, Novikov VK, Matyko PG, Galagudza MM. Animal experiments in the era of translational medicine. What would they be? *Translational Medicine*. 2017;4(2):52–70 (In Russ.). <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2017-4-2-52-70>
17. Llorens J, Li AA, Ceccatelli S, Suñol C. Strategies and tools for preventing neurotoxicity: to test, to predict and how to do it. *Neurotoxicology*. 2012;33(4):796–804. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.01.019>
18. Cashman CR, Höke A. Mechanisms of distal axonal degeneration in peripheral neuropathies. *Neurosci Lett*. 2015;596:33–50. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.048>
19. Hauser S, ed. *Harrison's Neurology in Clinical Medicine*. San Francisco: McGraw-Hill; 2010.
20. Wasinska-Borowiec W, Abri Aghdam K, Matias Saari J, Grzybowski A. An updated review on the most common agents causing toxic optic neuropathies. *Current Pharm Des*. 2017;23(4):586–95. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170124113826>
21. Lindhard Madsen M, Du H, Ejksjær N, Jensen P, Madsen J, Dybæk K. Aspects of vincristine-induced neuropathy in hematologic malignancies: a systematic review. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019;84(3):471–85. <https://doi.org/10.1007/s00280-019-03884-5>
22. Одинак ММ, Дыскин ДЕ. *Клиническая диагностика в неврологии*. СПб: СпецЛит; 2010. Odinak MM, Dyskin DE. *Clinical diagnostics in neurology*. St Petersburg: SpetsLit; 2010 (In Russ.). EDN: [QLVPOP](https://doi.org/10.30895/2312-7821-2020-8-3-151-159)
23. Tilson HA. Behavioral indices of neurotoxicity: what can be measured? *Neurotoxicol Teratol*. 1987;9(6):427–43. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(87\)90055-9](https://doi.org/10.1016/0892-0362(87)90055-9)
24. Schönfeld LM, Dooley D, Jahanshahi A, Temel Y, Hendrix S. Evaluating rodent motor functions: which tests to choose? *Neurosci Biobehav Rev*. 2017;83:298–312. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.10.021>
25. van Dellen A, Blakemore C, Deacon R, York D, Hannan AJ. Delaying the onset of Huntington's in mice. *Nature*. 2000;404:721–22. <https://doi.org/10.1038/35008142>
26. Deacon RM. Measuring motor coordination in mice. *J Vis Exp*. 2013;75:e2609. <https://doi.org/10.3791/2609>
27. Воронина ТА, Середенин СБ. Методические указания по изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия фармакологических веществ. В кн.: Хабриев РУ, ред. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Медицина; 2005. Voronina TA, Seredenin SB. Methodological guidelines for the study of the tranquilizing (anxiolytic) effect of phar-

- macological substances. In: Khabriev RU, ed. *Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances*. Moscow: Meditsina; 2005 (In Russ.). EDN: [QCII0B](#)
28. Ахапкина ВИ, Воронина ТА. Изучение противоинсультного действия фенотропила на модели геморрагического инсульта (интрацеребральная посттравматическая гематома) у крыс. *Нервные болезни*. 2006;(1):37–42. Akhapkina VI, Voronina TA. Study of the anti-stroke effect of phenotropil in a rat hemorrhagic stroke model (post-traumatic intracerebral hematoma). *Nervous Diseases*. 2006;(1):37–42 (In Russ.). EDN: [OQKJEX](#)
  29. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(7):519–29. <https://doi.org/10.1038/nrn2652>
  30. Takeshita H, Yamamoto K, Nozato S, Inagaki T, Tsuchimochi H, Shirai M, et al. Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline in skeletal muscle function in male mice. *Sci Rep*. 2017;(7):42323. <https://doi.org/10.1038/srep42323>
  31. Mintz EL, Passipieri JA, Lovell DY, Christ GJ. Applications of *in vivo* functional testing of the rat tibialis anterior for evaluating tissue engineered skeletal muscle repair. *J Vis Exp*. 2016;(116):54487. <https://doi.org/10.3791/54487>
  32. Chiu CS, Weber H, Adamski S, Rauch A, Gentile MA, Alves SE. Non-invasive muscle contraction assay to study rodent models of sarcopenia. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:246. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-12-246>
  33. Чичева ММ, Вихарева ЕВ, Мальцев АВ, Устюгов АА. Эволюция методик оценки моторной функции лабораторных грызунов, моделирующих нейродегенеративные заболевания. *Biomed Chem Res Meth*. 2018;1(3):e00030. Chicheva MM, Vikhareva EV, Maltsev AV, Ustyugov AA. Evolution of methods for assessing the motor function of laboratory rodents – neurodegenerative diseases models. *Biomed Chem Res Meth*. 2018;1(3):e00030 (In Russ.). <https://doi.org/10.18097/bmcr00030>
  34. Hsieh TH, Tsai JY, Wu YN, Hwang IS, Chen TJ, Chen JJJ. Time course quantification of spastic hypertonia following spinal hemisection in rats. *Neuroscience*. 2010;167(1):185–98. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.064>
  35. Ильинский НС, Тюнин МА, Матросова МО. Методические подходы к оценке паралитического синдрома токсического генеза в экспериментах на грызунах. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2021;(3):71–4. Ilinskiy NS, Tyunin MA, Matrosova MO. Methodological approaches to the assessment of paralytic syndrome of toxic genesis in experiments on rodents. *Laboratory Animals for Science*. 2021;(3):71–4 (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-03-09>
  36. Aoki KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. *Toxicon*. 2001;39(12):1815–20. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00101-5](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00101-5)
  37. Broide RS, Rubino J, Nicholson GS, Ardila MC, Brown MS, Aoki KR, et al. The rat Digit Abduction Score (DAS) assay: a physiological model for assessing botulinum neurotoxin-induced skeletal muscle paralysis. *Toxicon*. 2013;71:18–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.004>
  38. Nishitani A, Yoshihara T, Tanaka M, Kuwamura M, Asano M, Tsubota Y, et al. Muscle weakness and impaired motor coordination in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1-deficient rats. *Exp Anim*. 2020;69(1):11–7. <https://doi.org/10.1538/expanim.19-0067>
  39. Turner PV, Pang DS, Lofgren JL. A review of pain assessment methods in laboratory rodents. *Comp Med*. 2019;69(6):451–67. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-19-000042>
  40. Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:284. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284c>
  41. Modi AD, Parekh A, Pancholi YN. Evaluating pain behaviours: widely used mechanical and thermal methods in rodents. *Behav Brain Res*. 2023;446:114417. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114417>
  42. Bohic M, Pattison LA, Jhumka ZA. Mapping the neuroethological signatures of pain, analgesia, and recovery in mice. *Neuron*. 2023;111(18):2811–2830.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.06.008>
  43. Presto P, Ji G, Junell R, Griffin Z, Neugebauer V. Fear extinction-based inter-individual and sex differences in pain-related vocalizations and anxiety-like behaviors but not nociceptive reflexes. *Brain Sci*. 2021;11(10):1339. <https://doi.org/10.3390/brainsci11101339>
  44. Palazzo E, Marabese I, Gargano F, Guida F, Belardo C, Maione S. Methods for evaluating sensory, affective and cognitive disorders in neuropathic rodents. *Curr Neuropharmacol*. 2021;19(6):736–46. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200831153117>
  45. Chao D, Tran H, Hogan QH, Pan B. Analgesic dorsal root ganglion stimulation blocks both afferent and efferent spontaneous activity in sensory neurons of rats with monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022;30(11):1468–81. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2022.08.008>
  46. Бондаренко ДА, Дьяченко ИА, Скобцов ДИ, Мурашев АН. *In vivo* модели для изучения анальгетической активности. *Биомедицина*. 2011;(2):84–94. Bondarenko DA, Dyachenko IA, Skobtsov DI, Murashev AN. *In vivo* models of studying of analgetic activity. *Biomedicine*. 2011;(2):84–94 (In Russ.). EDN: [NVYEMF](#)
  47. Liu Q, Liu J, Guo M. Comparison of retinal degeneration treatment with four types of different mesenchymal stem cells, human induced pluripotent stem cells and RPE cells in a rat retinal degeneration model. *J Transl Med*. 2023;21(1):910. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04785-1>
  48. Gaillard D, Stratford JM. Measurement of behavioral taste responses in mice: two-bottle preference, lickometer, and conditioned taste-aversion tests. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2016;6(4):380–407. <https://doi.org/10.1002/cpmo.18>
  49. McFadden SL, Simmons AM, Erbe C, Thomas JA. Behavioral and physiological audiometric methods for animals. In: Erbe C, Thomas JA, eds. *Exploring animal behavior through sound*. Springer; 2022. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-97540-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-97540-1_10)
  50. Arevalo N. Open-source JL olfactometer for awake behaving recording of brain activity for mice engaged in olfactory tasks. In: Paredes RG, Portillo W, Bedos M, eds. *Animal models of reproductive behavior*. New York: Humana; 2023. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3234-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3234-5_6)
  51. Kimura J. *Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice*. Oxford University Press; 2013. <https://doi.org/10.1093/med/9780199738687.001.0001>
  52. Тюнин МА, Ильинский НС, Гоголевский АС, Кручинин ЕГ, Гладких ВД, Мацейчик ВА, Матросова МО. Электрофизиологические методы диагностики нарушений нервно-мышечной передачи при острых отравлениях фосфорорганическими соединениями. *Военно-медицинский журнал*. 2020;341(10):11–9. Tyunin MA, Ilinskii NS, Gogolevskii AS, Kruchinin EG, Gladkikh VD, Matsechik VA, Matrosova MO. Electrophysiological methods for the diagnosis of disorders of neuromuscular transmission in acute poisoning with organophosphorus compounds. *Russian Military Medical Journal*. 2020;341(10):11–9 (In Russ.). EDN: [NSYNCD](#)

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *Н.С. Ильинский* – концепция работы, написание и оформление текста рукописи; *М.А. Тюнин* – написание текста рукописи, поиск и работа с источниками литературы; *С.В. Чепур* – концепция работы, формулировка заключения, редактирование и утверждение окончательной версии рукописи для публикации; *В.А. Пугач* – написание текста рукописи, работа с источниками литературы, оформление рукописи; *В.А. Мясников* – планирование структуры рукописи и формулировка заключения, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Nikita S. Ilinskii* conceptualised the study, drafted and designed the manuscript. *Mikhail A. Tyunin* drafted the manuscript, searched literature and worked with the sources. *Sergey V. Chepur* conceptualised the study, formulated the conclusion, edited and approved the final version of the manuscript for publication. *Viktoriya A. Pugach* drafted the manuscript, worked with sources of literature, and designed the manuscript. *Vadim A. Myasnikov* planned the general structure of the manuscript, formulated the conclusion, and approved the final version of the manuscript for publication.

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Ильинский Никита Сергеевич**, канд. мед. наук / **Nikita S. Ilinskii**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7406-753X>

**Тюнин Михаил Александрович**, канд. мед. наук / **Mikhail A. Tyunin**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6974-5583>

**Чепур Сергей Викторович**, д-р мед. наук, профессор / **Sergey V. Chepur**, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5324-512X>

**Пугач Виктория Александровна**, канд. биол. наук / **Viktoriya A. Pugach**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4290-350X>

**Мясников Вадим Александрович**, канд. мед. наук / **Vadim A. Myasnikov**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6524-9371>

Поступила 01.03.2024

После доработки 01.04.2024

Принята к публикации 10.04.2024

Received 1 March 2024

Revised 1 April 2024

Accepted 10 April 2024



М.В. Мирошников   
 К.Т. Султанова   
 М.Н. Макарова   
 Н.М. Фаустова   
 С.О. Хан   
 Е.А. Лосева 

## Комплексная оценка функционального состояния мочевыделительной системы в доклинических исследованиях. Часть 1. Инструментальные и лабораторные методы оценки (обзор)

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

✉ **Мирошников Михаил Владимирович**; [miroshnikov.mv@doclinika.ru](mailto:miroshnikov.mv@doclinika.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Оценка функции мочевыделительной системы, и в большей степени почек, является важной задачей доклинических исследований. В настоящее время не существует общепризнанного и детального подхода к определению лекарственно-индуцированной нефротоксичности *in vivo* и четких критериев ее оценки.

**ЦЕЛЬ.** Систематизация инструментальных и лабораторных методов оценки функций мочевыделительной системы лабораторных животных и выявление основных принципов изучения нефротоксического действия лекарственных средств.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Проанализированы преимущества и ограничения методов исследования нефротоксичности лекарственных средств. Рассмотрены особенности их применения у мелких и крупных лабораторных животных. Целесообразно начинать оценку влияния веществ на мочевыделительную систему с малоинвазивных методов. Один из таких методов – анализ мочи, важными аспектами которого являются техника отбора и объем биоматериала, а также временной интервал между забором мочи и проведением теста. Наиболее доступным инструментальным методом в рамках доклинических исследований является ультразвуковое исследование, которое позволяет оценить положение органов, их размеры, структуру и экзогенность, обнаружить аномалии и изменения в режиме реального времени. Для каждого лабораторного вида предпочтительны свои настройки метода. К последующим этапам относятся макроскопическое изучение органов, измерение их массы и микроскопический анализ тканей. Визуально необходимо оценивать размеры, цвет и консистенцию мочеточников, мочевого пузыря и почек. Нефротоксичность может быть обнаружена в виде усиленного апоптоза, вакуолизации цитоплазмы эпителия почечных канальцев, дегенерации или дистрофии эпителия, отека, диапедезных кровоизлияний, острого канальцевого и папиллярного некроза, некроза капсулы Боумана – Шумлянского, возникновения слепков и кристаллов в просвете канальцев, развития гломерулопатий с соответствующими изменениями, а также воспалительных и сосудистых реакций.

**ВЫВОДЫ.** В результате анализа и систематизации инструментальных и лабораторных методов оценки функционального состояния мочевыделительной системы в доклинических исследованиях были обозначены основные принципы структурированного и всестороннего изучения потенциальной нефротоксичности новых лекарственных средств. Оценка нефротоксичности целесообразно начинать с простых и малоинвазивных лабораторных и инструментальных методов, к которым относится общий анализ мочи и микроскопия мочевого осадка, что позволяет определить наличие нарушения функции органа, еще не имеющего сопутствующего анатомического поражения. При более глубоком анализе следует использовать методы гистологического и иммуногистохимического исследований тканей органов мочевыделительной системы животных.

**Ключевые слова:** доклинические исследования; почки; нефротоксичность; мочевыделительная система; моча; анализ мочи; лабораторные животные; ультразвуковое исследование; УЗИ; патоморфологическое исследование

**Для цитирования:** Мирошников М.В., Султанова К.Т., Макарова М.Н., Фаустова Н.М., Хан С.О., Лосева Е.А. Комплексная оценка функционального состояния мочевыделительной системы в доклинических исследованиях. Часть 1. Инструментальные и лабораторные методы оценки (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):283–294. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-283-294>

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Потенциальный конфликт интересов.** М.Н. Макарова – член редакционной коллегии журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» с 2018 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Mikhail V. Miroshnikov ✉   
Kira T. Sultanova   
Marina N. Makarova   
Natalia M. Faustova   
Stanislav O. Khan   
Ekaterina A. Loseva 

## Complex Assessment of the Functional State of the Urinary System in Preclinical Studies. Part 1. Instrumental and Laboratory Assessment Methods (Review)

Research-and-manufacturing company “HOME OF PHARMACY”,  
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement,  
Vsevolzhsky district, Leningrad region 188663, Russian Federation

✉ **Mikhail V. Miroshnikov;** [miroshnikov.mv@doclinika.ru](mailto:miroshnikov.mv@doclinika.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Functional examination of the urinary system, and particularly the kidneys, is an important challenge in preclinical studies. Currently, there is no generally recognised and detailed approach to drug-induced nephrotoxicity detection *in vivo*, nor are there clear criteria for its assessment.

**AIM.** This study aimed to analyse and systematise instrumental and laboratory methods for the assessment of urinary system function in laboratory animals and to identify the basic principles for studying drug-induced nephrotoxic effects.

**DISCUSSION.** The study analysed the advantages and limitations of the methods used to study the nephrotoxicity of medicinal products, with considerations for the use of these methods in small and large laboratory animals. The effects of a test substance on the urinary system should first be evaluated using minimally invasive methods. One of these methods is urinalysis. For urinalysis, important considerations include the sampling technique, the volume of the biomaterial, and the turnaround time between urine collection and analysis. Ultrasonography is the most accessible instrumental method in preclinical studies. Ultrasonography can assess organ position, size, structure, and echogenicity and detect abnormalities and changes in real time. Different method settings are preferred for each species of laboratory animal. Further analysis can include macroscopic examination of organs, measurement of their masses, and microscopic analysis of tissues. Visual assessment should cover the size, colour, and consistency of the ureters, bladder, and kidneys. Nephrotoxicity may manifest as increased apoptosis, vacuolation of renal tubular epithelial cells, epithelial degeneration or dystrophy, oedema, diapedesis-associated haemorrhages, acute tubular and papillary necrosis, necrosis of the Bowman–Schumlansky capsule, casts and crystals in the tubular lumen, glomerulopathy with the corresponding changes, and inflammatory and vascular reactions.

**CONCLUSIONS.** The study analysed and systematised instrumental and laboratory methods for assessing the functional state of the urinary system in preclinical studies. The authors outlined the basic principles for a structured and comprehensive study of the potential nephrotoxicity of novel medicines. The assessment of nephrotoxicity should start with simple and minimally invasive laboratory and instrumental methods, which include general urinalysis and microscopic examination of urine sediment. These methods can detect organ dysfunction that has not yet presented with an associated anatomical lesion. A more in-depth analysis should involve histological and immunohistochemical methods to examine the urinary tissues of laboratory animals.

**Keywords:** preclinical studies; kidneys; nephrotoxicity; urinary system; urine; urinalysis; laboratory animals; ultrasonography; USG; necropsy

**For citation:** Miroshnikov M.V., Sultanova K.T., Makarova M.N., Faustova N.M., Khan S.O., Loseva E.A. Complex assessment of the functional state of the urinary system in preclinical studies. Part 1. Instrumental and laboratory assessment methods (review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):283–294. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-283-294>

**Funding.** The study was performed without external funding.

**Disclosure.** Marina N. Makarova has been a member of the Editorial Board of *Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2018; the other authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных задач доклинических исследований является оценка безопасности потенциальных фармакологически активных веществ [1, 2]. В контексте данной задачи должно быть определено влияние исследуемого препарата на функциональное состояние систем организма и выявлены органы-мишени его возможного токсического действия. В связи с этим возникает проблема выбора методов оценки безопасности препарата в отношении систем и органов.

В настоящее время среди всех представленных на рынке лекарственных средств около 20% обладают нефротоксическим потенциалом, который может быть реализован одним или несколькими общими патогенными механизмами: изменением внутриклубочковой гемодинамики, канальцевой токсичностью, воспалением, кристаллической нефропатией, рабдомиолизом и тромботической микроангиопатией [3, 4]. В доклинических исследованиях нефротоксичность выявляется лишь у 8% потенциальных фармакологически активных веществ [3–5]. В то же время для большинства тестируемых препаратов-кандидатов, проявивших нефротоксичность в клинических исследованиях, на доклиническом этапе не было обнаружено их влияния на мочевыделительную систему [6].

Методы *in silico* и *in vitro* [7, 8] хотя и решают проблему этики — использование большого количества животных в токсикологических исследованиях — и позволяют в некоторой степени прогнозировать безопасность и эффективность изучаемых веществ, но не в полной мере моделируют морфологические и функциональные особенности почки и, следовательно, не способны продемонстрировать комплексную реакцию, схожую с повреждениями *in vivo*, что в дальнейшем требует осторожной экстраполяции полученных результатов. Используемые в настоящее время стратегии прогнозирования лекарственной нефротоксичности требуют оптимизации

для корректной комплексной оценки функционального состояния мочевыделительной системы при разработке и изучении новых лекарственных средств (ЛС) [9]. Так, в регуляторных документах<sup>1</sup> упоминается, что в рамках исследования мочевыделительной системы следует изучить влияние исследуемого вещества на такие показатели работы почек, как объем и плотность мочи, осмоляльность, pH, водно-электролитный баланс, содержание белка в моче, цитологию мочи, а также некоторые биохимические маркеры в крови. Необходим четкий регламент, содержащий ясную и последовательную стратегию оценки нефротоксичности в доклинических исследованиях.

Цель работы — систематизация инструментальных и лабораторных методов оценки функций мочевыделительной системы лабораторных животных и выявление основных принципов изучения нефротоксического действия лекарственных средств.

В обзор включены публикации, доступные для поиска в базах данных PubMed и Google Scholar по состоянию на 16.02.2024. В приоритете были статьи, опубликованные за последние 5 лет.

Обзор не преследовал цели провести сравнительный анализ различных методик исследования и их статистических ограничений. Эта работа призвана обобщить последние достижения в исследованиях потенциального нефротоксического действия лекарственных средств, уделяя особое внимание применимости разных методов в отношении животных разных видов.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### Лабораторные методы оценки функций мочевыделительной системы в доклинических исследованиях

Лабораторные методы анализа мочи — наиболее простые для проведения, они достаточно информативны и не стрессогенны для животных.

<sup>1</sup> Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 27.10.2020 № 18 «О руководстве по исследованию фармакологической безопасности лекарственных препаратов для медицинского применения». ICH S7A Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals. CPMP/ICH/539/00. EMA; 2001.

Именно поэтому оптимальным вариантом для начального этапа оценки нефротоксичности ЛС в токсикологических исследованиях является общий анализ мочи с микроскопией осадка.

Важным аспектом при проведении любого лабораторного исследования является метод отбора биоматериала, а также временной интервал с момента забора мочи до момента непосредственного проведения лабораторного теста [10]. Наиболее достоверные результаты получают при сокращении временных интервалов [11]. Моча может храниться при комнатной температуре не более 2–3 ч, более длительное хранение в этих температурных условиях приводит к изменению ее физико-химических свойств. Если своевременное проведение исследования невозможно, то допускается хранение образца в холодильнике (+2...+8 °С) в течение 24 ч, также биообразец можно подвергнуть консервации (например, толуолом).

Способы получения мочи зависят от вида лабораторных животных, а также цели и дизайна эксперимента (табл. 1). Идеальный метод сбора мочи должен быть простым, не вызывающим стресса (как для животного, так и для человека), безболезненным и обеспечивающим получение образца надлежащего качества [12].

Отметим, что у грызунов (песчанки, хомяки, мыши, крысы, морские свинки) можно отобрать небольшой объем биоматериала. У кроликов

образцы мочи могут быть легко получены методом поглаживания брюшной стенки в области мочевого пузыря. У хищников (хорьки, кошки, собаки), карликовых свиней, приматов зачастую отбор незагрязненных проб мочи проводят с помощью цистоцентеза — под наркозом, с контролем ультразвуковым исследованием [12].

Посмертный способ забора также является приемлемым и несложным методом ввиду отсутствия движения животного и возможности одновременно взять большой объем биообразца. Недостатком отбора мочи непосредственно из мочевого пузыря во время эвтаназии является загрязнение пробы кровью, что может повлиять на проведение анализа и интерпретацию полученных данных [12].

При проведении исследования необходимо учитывать физико-химические особенности мочи разных видов лабораторных животных (табл. 2). Например, моча хомяка густая и кремообразная, но это физиологическая норма, а не пиурия. Почки песчанок чрезвычайно хорошо приспособлены для концентрирования мочи, в которой обычно содержится небольшое количество белка, глюкозы, билирубина и ацетона [12, 13].

Для разных видов животных характерен разный цвет мочи в норме, который зависит от концентрации растворенных в ней веществ и пигментов, выделяемых почками. Интенсивность цвета значительно варьируется в зависимости

Таблица 1. Методы сбора мочи у лабораторных животных

Table 1. Urine collection methods for laboratory animals

Животное <i>Animal</i>	Произвольное мочеиспускание <i>Voluntary voiding</i>		Пальпация / массаж <i>Palpation / massage</i>	Катетеризация <i>Catheterisation</i>	Цистоцентез <i>Cystocentesis</i>	Источник литературы <i>References</i>
	Метаболическая клетка <i>Metabolic cage</i>	Стекларус или каспийская галька <i>Glass beads or Caspian pebbles</i>				
Грызуны <i>Rodents</i>	+	+	+	+/-	+	[12–15]
Кролики <i>Rabbits</i>	+/-	+	+	+/-	+/-	[12–15]
Хищники <i>Carnivores</i>	–	+	+/-	+/-	+	[12, 13, 15]
Карликовые свиньи <i>Miniature pigs</i>	–	+	+/-	+/-	+	[12, 15]
Приматы <i>Primates</i>	–	+	+/-	+/-	+	[12, 15]

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

**Примечание.** «+» — метод применим для данного типа лабораторных животных; «+/-» — существуют сложности применения метода для сбора мочи у данного вида лабораторных животных; «-» — метод трудно или невозможно использовать для данного типа животных.

**Note.** +, applicable to the species of laboratory animal; +/-, not easily applicable to the species of laboratory animal; -, hardly applicable/inapplicable to the species of laboratory animal.

Таблица 2. Физико-химические особенности мочи здоровых лабораторных животных  
Table 2. Physicochemical characteristics of urine of healthy laboratory animals

Животное <i>Animal</i>	Параметры исследования <i>Parameters</i>							
	Объем мочи, мл/сут [15] <i>Urine volume, mL/day [15]</i>	Цвет мочи <i>Urine colour</i>	Относительная плотность <i>Specific gravity</i>	pH	Белок <i>Protein</i>	Глюкоза <i>Glucose</i>	Соли <i>Salts</i>	
Песчанка <i>Gerbil</i>	0,3–3,0		1,003–1,050 [16]	8,0–9,0 [16]	–		Карбонаты кальция [16] <i>Calcium carbonates [16]</i>	
Мышь <i>Mouse</i>	0,2–3,0		1,003–1,050 [16] 1,022–1,048 [21] 1,030–1,080 [22]	8,0–9,0 [16] 5,0–6,6 [32]	0,5–2,7 мг/сут [21] <i>0.5–2.7 mg/day [21]</i>	Следы [16] <i>Traces [16]</i>	Струвиты, трипельфосфаты [16] <i>Struvites, triple phosphates [16]</i>	
Хомяк <i>Hamster</i>	2,5–15,0	Прозрачная или светло- желтая [16] <i>Clear or light yellow [16]</i>	1,003–1,050 [16] >1,060 [23]	8,0–9,0 [16] 5,1–8,4 [33]	>10 мг/нед [16] <i>&gt;10 mg/week [16]</i>		Трипельфосфаты, карбонаты кальция [17] <i>Triple phosphates, calcium carbonates [17]</i>	
Крыса <i>Rat</i>	4,0–12,0		1,003–1,050 [16] 1,010–1,034 [24] 1,017–1,037 [25]	8,0–9,0 [16] 7,0–8,5 [34] 6,5–8,5 [35]	0,09–1,57 г/л [39] <i>0.09–1.57 g/L [39]</i>	Следы [16] <i>Traces [16]</i> 0,11–2,72 ммоль/л [39] <i>0.11–2.72 mmol/L [39]</i> , 0,0–9,9 г/дл [35] <i>0.0–9.9 g/dL [35]</i>	Струвиты, трипельфосфаты [16, 35] <i>Struvites, triple phosphates [16, 35]</i>	
Морская свинка <i>Guinea pig</i>	10,0–14,5		1,003–1,050 [16] 1,004–1,048 [26]	8,0–9,0 [16]	Отсутствует [40] <i>Not present [40]</i>	Отсутствует [16, 40] <i>Not present [16, 40]</i>		
Кролик <i>Rabbit</i>	13,0–31,0	Мутная, желтая, коричневая или красная [17] <i>Cloudy, yellow, brown, or red [17]</i>	1,003–1,036 [27]	7,5–9,0 [27]	Следы [17, 27] <i>Traces [17, 27]</i>	Следы [17, 27] <i>Traces [17, 27]</i>	Струвиты, карбонаты, оксалаты [17, 27] <i>Struvites, carbonates, oxalates [17, 27]</i>	
Хорек <i>Ferret</i>	13,0–15,0	Светло-желтая или желтая [18] <i>Light yellow or yellow [18]</i>	1,034–1,070 самцы [28] <i>1.034–1.070 males [28]</i> 1,026–1,060 самки [28] <i>1.026–1.060 females [28]</i>	5,0–6,5 самцы [28] <i>5.0–6.5 males [28]</i> 5,0–7,5 самки [28] <i>5.0–7.5 females [28]</i>	9,6±1,4 мг/дл самцы [41] <i>9.6±1.4 mg/dL, males [41]</i> 9,6±1,4 мг/дл самки [41] <i>9.6±1.4 mg/dL, females [41]</i> <0,3 г/л [28] <i>&lt;0.3 g/L [28]</i>	Отсутствует [41] <i>Not present [41]</i>	Аморфные ураты [28, 41] <i>Amorphous urates [28, 41]</i>	

Продолжение таблицы 2

Table 2 (continued)

Животное <i>Animal</i>	Параметры исследования <i>Parameters</i>									
	Объем мочи, мл/сут [15] <i>Urine volume, mL/day [15]</i>	Цвет мочи <i>Urine colour</i>	Относительная плотность <i>Specific gravity</i>	pH	Белок <i>Protein</i>	Глюкоза <i>Glucose</i>	Соли <i>Salts</i>			
Кошка <i>Cat</i>	23,0–50,0	Светло-желтая или желтая [18] <i>Light yellow or yellow [18]</i>	1,020–1,040 [29] 1,016–1,060 [29]	6,0–7,5 [18]	Следы [18] <i>Traces [18]</i>	Следы [18] <i>Traces [18]</i>				
Собака <i>Dog</i>	80,0–110,0	Светло-желтая [19] <i>Light yellow [19]</i>	1,010–1,050 [29]	5,5–7,7 [35, 36]	Следы [35, 36] <i>Traces [35, 36]</i>	0,0–3,0 мг/дл самцы [42] <i>0.0–3.0 mg/dL, males [42]</i> 1,0–3,0 мг/дл самки [42] <i>1.0–3.0 mg/dL, females [42]</i>	Трипельфосфаты, оксалаты кальция [18, 35, 36] <i>Triple phosphates, calcium oxalates [18, 35, 36]</i>			
Карликовая свинья <i>Miniature pig</i>	90,0–110,0	Светло-желтая [19] <i>Light yellow [19]</i>	1,010–1,025 самки [30] <i>1.010–1.025 females [30]</i>	5,0–9,0 самцы [30] <i>5.0–9.0 males [30]</i>	0,16–7,88 мг/дл самцы [30] <i>0.16–7.88 mg/dL, males [30]</i>	1,6–3,6 мг/дл самцы [30] <i>1.6–3.6 mg/dL, males [30]</i> 1,1–2,6 мг/дл самки [30] <i>1.1–2.6 mg/dL, females [30]</i>				
Яванская макака <i>Sumatran monkey</i>	90,0–110,0	Прозрачная или светло-желтая [20] <i>Clear or light yellow [20]</i>	1,005–1,009 [31]	7,0–9,0 самки [30] <i>7.0–9.0 females [30]</i>	0,08–4,65 мг/дл самки [30] <i>0.08–4.65 mg/dL, females [30]</i>					
Мармозетка <i>Common marmoset</i>	5,0–6,5			5,0–8,0 [37]	0,0–1,79 г/л [38] <i>0.0–1.79 g/L [38]</i>	–				

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

**Примечание.** Объем суточной мочи у мышей, лещанок, хомяков, крыс и иерунок собран при помощи метаболических клеток; у морских свинок, хорьков, кроликов – путем посадки животных на стеклярус в качестве подстилки; у кошек, собак, карликовых свиней и макак – путем посадки животных на каспийскую гальку; кетоны, билирубин, нитриты – в норме отсутствуют у всех представленных лабораторных животных; гемоглобин, лейкоциты и плоский эпителий – в норме отсутствуют или единичные у всех представленных лабораторных животных (0–5 в поле зрения). «–» – информация отсутствует.

**Note.** 24-hour urine samples were collected using metabolic cells (mice, gerbils, hamsters, rats, and marmosets), glass-bead litter (guinea pigs, ferrets, and rabbits), and Caspian pebbles (cats, dogs, miniature pigs, and monkeys). Normal samples from all the discussed animals should not contain ketones, bilirubin, or nitrites; haemoglobin, leucocytes, and squamous epithelial cells should be either absent or few in number (0–5 per field of view). –, no data.

от концентрации мочи, диеты и применяемых лекарственных препаратов. Концентрированная моча имеет темно-желтый цвет, тогда как разбавленная — бледно-желтый. По сравнению со стандартным желтым, более темный желтый цвет наблюдается в случае наличия билирубина и связанных с ним продуктов. Также моча темнеет при продолжительном хранении. Изменение цвета мочи происходит при разных патологических состояниях и часто зависит от присутствия в ней крови (красноватый оттенок), гемоглобина (красно-коричневый цвет), метгемоглобина (черный цвет). Также на цвет мочи могут влиять питание и прием ЛС. Например, при применении фенолов моча становится темной или темно-зеленой, препараты карболовой кислоты изменяют цвет мочи до коричневого или черного, метиленовая синька — до зеленовато-синего. При применении фенотиазина или сульфантрола моча приобретает цвет от желтого до ярко-красного [12, 13].

Для оценки помутнения мочи недостаточно ее визуальной оценки, необходимо проведение микроскопического исследования. Наиболее распространенной причиной помутнения мочи является кальциурия, которая в некоторой степени нормальна для грызунов. Другими причинами помутнения мочи могут быть лейкоциты, эритроциты, эпителиальные клетки, бактерии и слизь.

#### **Инструментальные методы оценки функций мочевыделительной системы**

Методы ультразвуковых, рентгенологических исследований и магнитно-резонансная томография позволяют прижизненно получить детальную информацию о работе органа, выявить патологии и оценить влияние различных факторов на его строение и функцию. Использование данных методов параллельно с лабораторными дополняет информацию о структуре и функциональной активности органа, визуализируя его.

В рамках доклинических исследований наиболее доступным методом является ультразвуковое исследование (УЗИ) [43]. Метод позволяет оценить положение органов, их размеры, структуру, экзогенность, а также обнаружить различные аномалии и изменения в режиме реального времени. Посредством УЗИ возможно идентифицировать кисты, которые представляют собой структуры, заполненные жидкостью, и поэтому видны как черные круглые образования в ткани. Гидронефроз качественно распознается как растяжение и дилатация почечной лоханки. Опухолевые образования будут иметь оттенки серого, отличные от окружающих тканей,

и, увеличиваясь, будут искажать правильную бобовидную форму почки [44].

Для проведения процедуры необходимо предварительно подготовить животное — ввести его в состояние наркоза и удалить шерстный покров с соответствующей части тела [45]. Для взрослых крыс при ультразвуковом исследовании почек (животное находится в положении лежа на спине), как правило, используют частоты 15–20 МГц, для половозрелых мышей — 30–40 МГц, а для визуализации их эмбрионов используют более высокие частоты — до 50 МГц [45].

У лабораторных кроликов изображения получают при помощи линейного преобразователя частотой 4–8,5 МГц. Для ультразвукового исследования мочевого пузыря и уретры предпочтительно использовать трансабдоминальный доступ, при этом животное должно находиться в положении лежа на спине. Следует отметить, что у кроликов из-за объемного желудочно-кишечного тракта невозможно проводить визуализацию ненаполненного мочевого пузыря, а визуализация почек невозможна в положении лежа на спине, поэтому животное располагается лежа на животе [46].

У кошек и собак мелких пород для исследования рекомендуется использовать высокочастотный датчик — 7,5 МГц и выше, тогда как для исследования почек у крупных собак необходим датчик с большей проникающей способностью (5 МГц и ниже). Исследование можно проводить в дорсальном, левом или правом боковом положении. Для ультразвукового исследования мочевого пузыря и уретры в области лонной кости предпочтительно проводить исследование, используя трансабдоминальный доступ, при этом животное должно находиться в положении лежа на спине [47].

Для проведения УЗИ у карликовых свиней требуется линейный датчик с большей проникающей способностью (5 МГц и ниже). Для фиксации животное помещается в рестрейнер, лежа на спине. Анестезия используется при необходимости в случае повышенной эмоциональности. Хорошей визуализации поддается мочевой пузырь, а уретра у самцов — только у основания мочевого пузыря. Мочеточники визуализируются плохо [48].

Для исследования яванских макак рекомендуется использовать высокочастотный датчик 7,5 МГц. Исследование проводится под общей анестезией в положении лежа как на правом, так и на левом боку. Мочевой пузырь поддается хорошей

визуализации, плохо визуализируется уретра. Мочеточник не виден ни при одном обследовании, даже когда мочевого пузыря полон [49].

Для обеспечения воспроизводимости и упрощения рабочего процесса рекомендуется сохранять настройки для всех режимов визуализации и приложений.

Следует отметить, что ультразвуковое исследование – это экономически доступная процедура, а сам прибор занимает незначительную площадь в лаборатории. Дополнительно возможно проведение компьютерной и магнитно-резонансной томографии, которые в большей степени являются подтверждающими и расширяющими информацию, полученную в ходе ультразвукового исследования.

### Патоморфологические методы оценки

Согласно рекомендациям<sup>2</sup> в стандартный минимальный перечень органов и тканей, подлежащих гистопатологическому исследованию, входят почки и мочевого пузыря. При необходимости перечень может быть расширен за счет включения дополнительных органов-мишеней. В доклинических исследованиях токсичности наиболее надежным доказательством лекарственно-индуцированного поражения почек является выявление дозозависимых повреждений, для чего используют макроскопическое изучение органов, измерение их массы, и микроскопический анализ тканей [50].

Визуально необходимо оценивать размеры, цвет, консистенцию почек, ее капсулу, на разрезе – состояние коркового и мозгового слоев, почечный сосочек, лоханку. Необходимо также принимать во внимание видовые особенности органов. Так, например, карликовым свиньям свойственна гладкая почка с несколькими почечными сосочками и чашечками, в отличие от большинства других лабораторных животных с гладкой однососочковой почкой. Следует отметить важность последующей подготовки материала для гистологического исследования – вырезки фрагментов тканей после фиксации. В микропрепаратах необходимо оценить все структуры почки, особенно почечного сосочка и лоханки, поэтому продольный срез более информативен ввиду увеличения доступной для анализа площади органа [51].

Для рутинного исследования мочеточников и мочевого пузыря производится поперечный

срез, проходящий через все оболочки. Так же необходимо учитывать изменения, обнаруженные при макроскопическом исследовании.

Для правильной оценки нефротоксичности крайне важны данные о массе почек, изменение которой часто коррелирует с другими показателями. Множественные патологические процессы при их достаточной тяжести и (или) распространенности могут вызывать изменение массы почек. Например, увеличение массы почек, сопровождающееся отеком и бледностью при обследовании невооруженным глазом, было общепринятым признаком почечной токсичности в течение многих лет.

Масса почек у лабораторных животных, по-видимому, не имеет тесной взаимосвязи с массой тела, как у человека. В токсикологических исследованиях часто наблюдаются незначительные дозозависимые изменения массы почек без каких-либо четких гистопатологических свидетельств клеточных изменений. Во многих случаях это можно рассматривать как функциональные изменения или адаптивные реакции на серьезные физиологические изменения, вызванные введением высоких доз активных фармацевтических веществ, например ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента. Однако умеренное отклонение массы почек следует интерпретировать с осторожностью [50, 52]. Именно поэтому гистопатологическая оценка остается важным методом исследования, поскольку незначительные изменения массы почек могут быть связаны с целым рядом различных патологических процессов, таких как дегенерация и некроз почечных канальцев, а также вакуолизация эпителия почечных канальцев, тубулоинтерстициальное воспаление, закупорка нефронов кристаллами [50]. Или, например, гипертрофия нефрона, которая может быть связана с повышенной функциональной нагрузкой, такой как усиление скорости клубочковой фильтрации и изменение потока жидкости в канальцах, что может возникать при диете с высоким содержанием белка, после односторонней нефрэктомии или на фоне приема диуретиков. При этом умеренные степени гипертрофии почечных канальцев может быть трудно распознать на обычных гистологических срезах [53].

Как правило, обычного окрашивания гематоксилин-эозином достаточно для определения места и типа почечного поражения, но в определенных

<sup>2</sup> 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».

ситуациях могут потребоваться специальные методы окрашивания, такие как импрегнация солями серебра или применение периодической кислоты Шиффа для диагностики небольших малозаметных изменений клубочков и базальных мембран. Для оценки выраженности фиброза используется трихромное окрашивание по Массону или по Ван Гизону, для выявления амилоида – Конго красный, для обнаружения депозитов гемосидерина – окраска по Перлсу, для выявления липидов – Oil Red O и др. [54]. Примеры поражений почек представлены на *рисунке 1 «Примеры морфологического проявления нефротоксичности»*, опубликован на сайте журнала<sup>3</sup>.

Существует три основных типа патологии, связанной с лекарственно-индуцированной почечной недостаточностью:

- аллергическая дозозависимая реакция, приводящая к тубулоинтерстициальному нефриту;
- дозозависимый острый канальцевый некроз вследствие прямого токсического поражения;
- обструктивная нефропатия вследствие образования кристаллов ЛС или его метаболитов в дистальной части нефрона [55].

Различные полипептидные и белковые антигены могут быть использованы в качестве иммуноцитохимических маркеров при оценке повреждения почек. Одним из примеров является ренин, который присутствует в юктагломерулярном аппарате и миоэпителиальных клетках почечных артерий и афферентных артериол. Белки Тамма–Хорсфолла (уромодулин), расположенные на поверхностной мембране толстого восходящего ответвления петли Генле, могут быть визуализированы с помощью иммуноцитохимии. Антитела к цитокератинам, десмину и виментину также используются для избирательного окрашивания сегментов нефрона и мезанхимальных клеток. Повреждение подоцитов, по-видимому, может отражаться в экспрессии десмина. Белок цитоскелета  $\alpha$ -актин, специфичный для гладкой мускулатуры сосудов и перицитов, присутствует в активированных мезангиальных клетках. Иммуноцитохимические методы могут быть использованы для определения местоположения антигенных сайтов ферментов, включая цитохромы P450 и  $\gamma$ -глутамилтранспептидазу.

Гибридизацию *in situ* также можно сочетать с иммуноцитохимией для изучения временных и пространственных взаимосвязей между экспрессией мРНК и белка в нормальной и пораженной почечной ткани. Зонды для определения

лизоцима, ингибитора активатора плазминогена-1 (SERPINE1), фактора роста тромбоцитов (PRP), фибронектина, тромбоспадина и мРНК ренина использовались при изучении экспериментального гломерулонефрита и изменений, вызванных лекарственными препаратами. Пероксидаза и меченные флуоресценцией лектины, которые маркируют специфические группы сахаров или последовательности в почках млекопитающих, могут быть использованы для определения структурных компонентов почечной ткани в гистологических срезах, зафиксированных в формалине и залитых парафином. Часто наблюдаются согласованные паттерны окрашивания лектинами в различных сегментах нефрона, хотя они не идентичны у разных видов животных [56].

При гистологическом исследовании почек животных нефротоксичность может быть обнаружена в виде усиленного апоптоза, вакуолизации цитоплазмы эпителия почечных канальцев, дегенерации или дистрофии эпителия, отека, диапедезных кровоизлияний, острого канальцевого некроза (проксимальные канальцы), папиллярного некроза, некроза капсулы Боумена–Шумлянско-го, возникновения слепков и кристаллов в просвете канальцев, развития гломерулопатий с соответствующими изменениями, а также воспалительных и сосудистых реакций [53]. Развитие тех или иных морфологических изменений зависит от молекулярного механизма действия конкретного препарата. Например, гентамицин вызывает тубулярный некроз, вакуолизацию эпителия проксимальных канальцев, мезангиальную гиперцеллюлярность, пролиферацию гломерулярного эндотелия, отек интерстиция коркового слоя, расширение капилляров и застой крови в них. Ацетаминофен (парацетамол) инициирует развитие острого тубулярного некроза, острого интерстициального нефрита [57].

Хотя биопсия почек широко используется в клинической диагностике, ее редко применяют в экспериментальной работе на животных, особенно на мелких грызунах, поскольку проблемы хирургического повреждения почек и кровотечений в настоящее время являются нерешенными. Основные причины заключаются в том, что биопсию почек животных необходимо проводить при прямом воздействии на почки, объем которых у животных, особенно грызунов, невелик. Таким образом, количество возможных заборов тканей ограничено, а множественные биопсии легко вызывают остаточное повреждение функции почек. Хотя в настоящий момент

<sup>3</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-283-294-fig1>

ведутся работы по усовершенствованию данного метода в доклинических исследованиях и интегрированию его в исследовательскую практику, пока возможность применения биопсий для оценки работы почек лабораторных животных сильно ограничена [58].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ методов оценки функции мочевыделительной системы, используемых в доклинических исследованиях, с точки зрения их информативности, приемлемости для мелких и крупных лабораторных животных, стоимости и сложности постановки. При изучении влияния фармакологически активных веществ на мочевыделительную систему животных необходим рациональный комплексный и поэтапный

подход. Применяются различные инструментальные, лабораторные и патоморфологические методы оценки нефротоксичности, каждый из которых обладает как определенными преимуществами, так и ограничениями. Оценку нефротоксичности целесообразно начинать с малоинвазивных лабораторных и инструментальных методов (общий анализ мочи и микроскопия), что позволит определить наличие нарушения функции органа, еще не имеющего сопутствующего анатомического поражения. При более глубоком анализе следует использовать методы гистологического и иммуногистохимического исследований тканей органов мочевыделительной системы животных, а также проводить определение специфических маркеров почечного повреждения.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Енгальчева ГН, Сюбаев РД, Горячев ДВ. Исследования фармакологической безопасности лекарственных средств: экспертная оценка полученных результатов *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2017;7(2):92–7.  
Engalycheva GN, Syubaev RD, Goryachev DV. Safety pharmacology studies of medicinal products: evaluation of results. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017;7(2):92–7 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2017-7-2-92-97>
2. Pognan F, Beilmann M, Boonen H, Czich A, Dear G, Hewitt P, et al. The evolving role of investigative toxicology in the pharmaceutical industry. *Nat Rev Drug Discov*. 2023;22(4):317–35.  
<https://doi.org/10.1038/s41573-022-00633-x>
3. Wu H, Huang J. Drug-induced nephrotoxicity: pathogenic mechanisms, biomarkers and prevention strategies. *Current Drug Metabolism*. 2018;19(7):559–67.  
<https://doi.org/10.2174/1389200218666171108154419>
4. Kim SY, Moon A. Drug-induced nephrotoxicity and its biomarkers. *Biomolecules & Therapeutics*. 2012;20(3):268–72.  
<http://dx.doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.3.268>
5. Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(8):711–6.  
<https://doi.org/10.1038/nrd1470>
6. Troth SP, Simutis F, Friedman GS, Todd S, Sistare FD. Kidney safety assessment: current practices in drug development. *Seminars in Nephrology*. 2019;39(2):120–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2018.12.002>
7. Евтеев ВА, Семенова ИС, Бунятян НД, Прокофьев АВ. Оценка нефротоксических свойств фавипиравира на модели клеточной линии RPTEC. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(4):423–29.  
Evtееv VA, Semenova IS, Bunyatyan ND, Prokofiev AV. Evaluation of nephrotoxic properties of favipiravir using the RPTEC line model. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(4):423–29 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-4-423-429>
8. Евтеев ВА, Бунятян НД, Демченкова ЕЮ, Прокофьев АВ. Сравнительная оценка рекомендаций по доклиническим исследованиям межлекарственного взаимодействия на уровне транспортеров. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2023;13(4):560–6.  
Evtееv VA, Bunyatyan ND, Demchenkova EYu, Prokofiev AV. Comparative evaluation of recommendations for preclinical studies of transporter-mediated drug–drug interactions. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(4):560–6 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-4-560-566>
9. Брюханов ВМ, Зверев ЯФ, Лампатов ВВ, Жариков АЮ. Методические подходы к изучению функции почек в эксперименте на животных. *Нефрология*. 2009;13(3):52–62.  
Briukhanov VM, Zverev Ya F, Lampatov VV, Zharikov A Yu. Methodical approaches to the study of renal function in animal experiments. *Nephrology*. 2009;13(3):52–62 (In Russ.).
10. Васютина МЛ, Галагудза ММ, Гушин ЯА, Ивкин ДЮ, Ильинский НС, Матуа АЗ и др. Референтные интервалы. Показатели нормы у лабораторных животных В кн: *Консультант GLP-Planet 2022. Мнение фармацевтической отрасли*. СПб., 2022. С. 72–95.  
Vasyutina ML, Galagudza MM, Gushchin YA, Ivkin DU, Ilyinsky NS, Matua AZ, et al. Reference intervals. Normal values in laboratory animals. In: *Consultant GLP-Planet 2022. The opinion of the pharmaceutical industry*. St Petersburg, 2022. P. 72–95 (In Russ.).
11. Павлова ВЮ, Денисенко ВЕ, Чеснокова ЛД, Анешина ИИ. Диагностические возможности исследования мочи. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2022;7(4):122–35.  
Pavlova VY, Denisenko VE, Chesnokova LD, Aneshina II. Diagnostic possibilities of urinalysis. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2022;7(4):122–35 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2022-7-4-122-135>
12. Kurien BT, Everds NE, Scofield RH. Experimental animal urine collection: a review. *Laboratory Animals*. 2004;38(4):333–61.  
<https://doi.org/10.1258/0023677041958945>
13. Yadav SN, Ahmed N, Nath AJ, Mahanta D, Kalita MK. Urinalysis in dog and cat: a review. *Veterinary World*. 2020;13(10):2133–41.  
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2133-2141>
14. Трофимец ЕИ, Кательникова АЕ, Крышень КЛ. Получение образцов мочи у лабораторных животных (обзор). *Лабораторные животные для научных исследований*. 2021;01:30–47.  
Trofimets EI, Katelnikova AE, Kryshen KL. Urine collecting samples from laboratory animals (overview). *Laboratory Animals for Science*. 2021; 01: 30–47 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-01-04>

15. Мирошников МВ, Султанова КТ, Ковалева МА, Акимова МА, Макарова МН. Определение референтных интервалов клиренса эндогенного креатинина у лабораторных животных. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2022;4:21–30.  
Miroshnikov MV, Sultanova KT, Kovaleva MA, Akimova MA, Makarova MN. Determination of reference intervals of creatinine clearance in laboratory animals. *Laboratory Animals for Science*. 2022;4:21–30 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.57034/2618723X-2022-04-03>
16. Jenkins JR. Rodent Diagnostic Testing. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 2008;17(1):16–25.  
<https://doi.org/10.1053/j.jepm.2007.12.004>
17. Jenkins JR. Rabbit diagnostic testing. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 2008;17(1):4–15.  
<https://doi.org/10.1053/j.jepm.2007.12.003>
18. Yadav SN, Ahmed N, Nath AJ, Mahanta D, Kalita MK. Urinalysis in dog and cat: a review. *Veterinary World*. 2020;13(10):2133.  
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2133-2141>
19. Grahofner A, Björkman S, Peltoniemi O. Diagnosis of endometritis and cystitis in sows: use of biomarkers. *Journal of Animal Science*. 2020;98(1):107–16.  
<https://doi.org/10.1093/jas/skaa144>
20. Park HK, Cho JW, Lee BS, Park H, Han JS, Yang MJ, et al. Reference values of clinical pathology parameters in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) used in preclinical studies. *Laboratory Animal Research*. 2016;32:79–86.  
<https://doi.org/10.5625/lar.2016.32.2.79>
21. Luong RH. The laboratory mouse. In: Kurtz DM, Travlos GS, eds. *The clinical chemistry of laboratory animals*. 2018.
22. Lyon MF, Hulse EV. An inherited kidney disease of mice resembling human nephronophthisis. *Journal of Medical Genetics*. 1971;8(1):41–8.  
<https://doi.org/10.1136/jmg.8.1.41>
23. Clifford CB, Simmons JH. The laboratory hamster. In: Kurtz DM, Travlos GS, eds. *The clinical chemistry of laboratory animals*. 2018. P. 1–32.
24. Fent K, Mayer E, Zbinden G. Nephrotoxicity screening in rats: a validation study. *Arch Toxicol*. 1988;61:349–58.  
<https://doi.org/10.1007/BF00334615>
25. Трашков АП, Васильев АГ, Коваленко АЛ, Тагиров НС. Метаболическая терапия мочекаменной болезни на различных моделях поражения почек у крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2015;78(3):17–21.  
Trashkov AP, Vasiliev AG, Kovalenko AL, Tagirov N S. Metabolic therapy of nephrolithiasis in two different rat models of kidney disease. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2015;78(3):17–21 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.30906/0869-2092-2015-78-3-17-21>
26. Cernochova H, Hundakova A, Bardi E, Knotek Z. Biochemical profile of urine in guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Vet Med Czech* 2020;65(10):445–50.  
<https://doi.org/10.17221/32/2020-VETMED>
27. Melillo A. Rabbit clinical pathology. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 2007;16(3):135–45.  
<https://doi.org/10.1053/j.jepm.2007.06.002>
28. Eshar D, Wyre NR, Brown DC. Urine specific gravity values in clinically healthy young pet ferrets (*Mustela furo*). *Journal of Small Animal Practice*. 2012;53(2):115–9.  
<https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2011.01173.x>
29. Reece WO, The Kidneys and Urinary System. In: Reece WO ed. *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 2015. P. 157–202
30. Park HK, Cho JW, Lee BS, Park H, Han JS, Yang MJ, et al. Reference values of clinical pathology parameters in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) used in preclinical studies. *Laboratory Animal Research*. 2016;32(2):79–86.  
<https://doi.org/10.5625/lar.2016.32.2.79>
31. Winn CB, Issa EB, Curcillo CP, Townes CA, Burns MA, Patterson MM. Daily water intake by common marmosets (*Callithrix jacchus*) and recommendations regarding fluid regulation. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2019;58(1):16–20.  
<https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-18-000046>
32. Kovacicova J, Winter C, Löffing-Cueni D, Löffing J, Finberg KE, Lifton RP, et al. The connecting tubule is the main site of the furosemide-induced urinary acidification by the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Kidney international*. 2006;70(10):1706–16.
33. Washington IM, Van Hoosier G. Clinical biochemistry and hematology. In: Suckow MA, Stevens KA, Wilson RP. ed. *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents*. Academic Press. 2012. P. 57–116.
34. Reagan WJ, VanderLind B, Shearer A, Botts S. Influence of urine pH on accurate urinary protein determination in Sprague-Dawley rats. *Veterinary clinical pathology*. 2007;36(1):73–78.
35. Sauer MB, Dulac H, Clark S, Moffitt KM, Price J, Dambach D et al. Clinical pathology laboratory values of rats housed in wire-bottom cages compared with those of rats housed in solid-bottom cages. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2006;45(1):30–35.
36. Van Metre DC, Angelos SM. Miniature pigs. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. 1999;2(3):519–37.  
[https://doi.org/10.1016/S1094-9194\(17\)30108-1](https://doi.org/10.1016/S1094-9194(17)30108-1)
37. Yamada N, Sato J, Kanno T, Wako Y, Tsuchitani M. Morphological study of progressive glomerulonephropathy in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Toxicologic Pathology*. 2013;41(8):1106–15.  
<https://doi.org/10.1177/0192623313478206>
38. Collins MG, Rogers NM, Jesudason S, Kireta S, Brealey J, Coates PT. Spontaneous glomerular mesangial lesions in common marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a benign non-progressive glomerulopathy. *Journal of Medical Primatology*. 2014;43(6):477–87.  
<https://doi.org/10.1111/jmp.12134>
39. Everds NE, Ramaiah L. The laboratory rat. In: Kurtz DM, Travlos GS, eds. *The clinical chemistry of laboratory animals*. 2018. P. 33–79
40. Sharp P. The laboratory guinea pig. In: Kurtz DM, Travlos GS, eds. *The clinical chemistry of laboratory animals*. 2018. P. 305–31
41. Patterson MM, Fox JG. 9 The laboratory ferret. In: Kurtz DM, Travlos GS, eds. *The clinical chemistry of laboratory animals*. 2018. P. 331–44
42. Stricker-Krongrad A, Brown LD, Bouchard GF, Swindle MM, Casteel SW.5 The laboratory pig. In: Kurtz DM, Travlos GS, eds. *The clinical chemistry of laboratory animals*. 2018. P. 154–211
43. Meyer S, Fuchs D, Meier M. Ultrasound and photoacoustic imaging of the kidney: basic concepts and protocols. In: Pohlmann A, Niendorf T. ed. *Preclinical MRI of the kidney: methods and protocols*. Springer Nature, 2021. P. 109–130
44. Greco A, Mancini M, Gargiulo S, Gramanzini M, Claudio PP, Brunetti A, et al. Ultrasound biomicroscopy in small animal research: applications in molecular and preclinical imaging. *BioMed Research International*. 2012;2012.  
<https://doi.org/10.1155/2012/519238>
45. Moran CM, Thomson AJW. Preclinical ultrasound imaging—a review of techniques and imaging applications. *Frontiers in Physics*. 2020;8:124.  
<https://doi.org/10.3389/fphy.2020.00124>
46. Banzato T, Bellini L, Contiero B, Selli P, Zotti A. Abdominal ultrasound features and reference values in 21 healthy rabbits. *Veterinary Record*. 2015;176(4):101–101.  
<https://doi.org/10.1136/vr.102657>

47. Larson MM, The kidneys and ureters. In: O'Brien R, Frances B. ed. *BSAVA manual of canine and feline abdominal imaging*. British Small Animal Veterinary Association, 2009. P. 185–204.
48. Маннион П. *Ультразвуковая диагностика заболеваний мелких домашних животных*. М.: «Аквариум». 2008. Mannion P. *Ultrasound diagnostics of diseases of small domestic animals*. Moscow: Aquarium, 2008. (In Russ.).
49. Gaschen L, Menninger K, Schuurman HJ. Ultrasonography of the normal kidney in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*): morphologic and Doppler findings. *Journal of Medical Primatology*. 2000;29(2):76–84. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0684.2000.290205.x>
50. Ennulat D, Ringenberg M, Frazier KS. Toxicologic Pathology Forum Opinion Paper\*: recommendations for a tiered approach to nonclinical mechanistic nephrotoxicity evaluation. *Toxicol Pathol*. 2018;46(6):636–46. <https://doi.org/10.1177/0192623318788302>
51. Morawietz G, Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Bube A, Keane K, Halm S, et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice. Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol*. 2004;55(6):433–49. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00350>
52. Sellers RS, Morton D, Michael B, Roome N, Johnson JK, Yano BL, et al. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicol Pathol*. 2007;35(5):751–5. <https://doi.org/10.1080/01926230701595300>
53. Frazier KS, Seely JC, Hard GC, Betton G, Burnett R, Nakatsuji S, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse urinary system. *Toxicol Pathol*. 2012;40(4):14–86. <https://doi.org/10.1177/0192623312438736>
54. Гушин ЯА. Применение дополнительных гистологических методов окраски в доклинических исследованиях. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2019;4:7 Gushchin YA. Additional histological methods of staining in preclinical studies. *Laboratory Animals for Science*. 2019;4:7 (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-04-07>
55. Perazella MA. Drug-induced nephropathy: an update. *Expert Opin Drug Saf*. 2005;4(4):689–706. <https://doi.org/10.1517/14740338.4.4.689>
56. Greaves P. Urinary Tract. In: Greaves P. *Histopathology of preclinical toxicity studies*. Elsevier Science; 2007. P. 570–660. <https://doi.org/10.1016/b978-044452771-4/50011-0>
57. Conn P.M. *Animal models for the study of human disease*. UK: Academic Press; 2017.
58. Mao X, Wang C, Xu Z, He Y, Hou Y, Li B. A Novel standardized method of renal biopsy in mice. *Kidney Dis (Basel)*. 2021;7(4):306–14. <https://doi.org/10.1159/000513354>

**Дополнительная информация.** На сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» размещен рисунок 1. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-283-294-fig1>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: М.В. Мирошников – сбор, анализ и систематизация данных литературы, написание текста и оформление рукописи; К.Т. Султанова – анализ и обобщение данных литературы, оформление, редактирование и переработка текста рукописи; М.Н. Макарова – идея работы, критический пересмотр текста рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; Н.М. Фаустова, С.О. Хан, Е.А. Loseva – сбор и систематизация данных литературы.

**Additional information.** Figure 1 is posted on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-283-294-fig1>

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Mikhail V. Miroshnikov* collected, analysed, and systematised literature data; drafted and designed the manuscript. *Kira T. Sultanova* analysed and summarised literature data; designed, edited, and revised the manuscript. *Marina N. Makarova* conceived the study idea, critically revised the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication. *Natalia M. Faustova, Stanislav O. Khan, and Ekaterina A. Loseva* collected and systematised literature data.

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Мирошников Михаил Владимирович**, канд. мед. наук / **Mikhail V. Miroshnikov**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9828-3242>

**Султанова Кира Тимуровна**, канд. мед. наук / **Kira T. Sultanova**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9846-8335>

**Макарова Марина Николаевна**, доктор мед. наук / **Marina N. Makarova**, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>

**Фаустова Наталья Михайловна**, канд. хим. наук / **Natalia M. Faustova**, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>

**Хан Станислав Олегович** / **Stanislav O. Khan**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6792-2091>

**Лосева Екатерина Александровна** / **Ekaterina A. Loseva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4668-217X>

Поступила 29.02.2024

После доработки 26.03.2024

Принята к публикации 10.04.2024

Received 29 February 2024

Revised 26 March 2024

Accepted 10 April 2024



А.О. Вернер   
Т.М. Устинова   
Н.Г. Венгерович 

## Оптимизация методики приготовления цитогенетических препаратов при проведении метафазного анализа клеток костного мозга млекопитающих *in vivo*

Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, ул. Лесопарковая, д. 4, Санкт-Петербург, 195043, Российская Федерация

✉ Вернер Анна Олеговна; [gniiivm\\_5@mil.ru](mailto:gniiivm_5@mil.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Для определения мутагенности лекарственных средств используется метафазный анализ, точность теста напрямую зависит от качества приготовленных цитогенетических препаратов. Возможная артефактная потеря хромосом, приводящая к ошибкам при трактовке результатов, длительность и трудоемкость пробоподготовки обуславливают необходимость совершенствования существующих методик подготовки цитогенетических препаратов.

**ЦЕЛЬ.** Оптимизация методики приготовления цитогенетических препаратов клеток костного мозга млекопитающих *in vivo* для метафазного анализа.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Исследования выполнены на беспородных мышам-самцах массой 18–20 г. Пробоподготовку цитогенетических препаратов костного мозга выполняли по оригинальным и адаптированным методикам «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. Миронова А.Н. (2012 г.) и ГОСТ 34659-2020 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Оценка хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих». Для приготовления препаратов использовали раствор Хенкса, растворы цитрата натрия и хлорида калия, уксусную кислоту, метиловый спирт, среду 199, буферный раствор HEPES и краситель Гимзы.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Проведен сравнительный экспериментальный анализ характеристик цитогенетических препаратов для проведения метафазного анализа клеток костного мозга млекопитающих *in vivo*, подготовленных по различным методикам. Выявлено, что препараты, полученные по методике «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств», характеризовались максимальной долей доступных для анализа пластинок по сравнению с препаратами, полученными другими способами пробоподготовки. Оптимизированы условия пробоподготовки, в том числе состав гипотонического раствора (0,56% раствора KCl), время гипотонической обработки (20 мин) и фиксации (12 ч), состав культуральной среды (среда 199 жидкая с солями Хенкса с глутамином), введена стадия префиксации хромосом 6%-ным раствором уксусной кислоты, что в целом способствовало увеличению доли доступных для анализа метафазных пластинок путем снижения разброса и слипания хромосом.

**ВЫВОДЫ.** Предложена методика приготовления цитогенетических препаратов, позволяющая увеличить долю доступных метафазных пластинок для анализа до 56%, долю хромосом с полным набором ( $n=40$ ) на 12% и сократить время приготовления образцов на 2–10 ч по сравнению с использовавшимися ранее методиками.

**Ключевые слова:** метафазный анализ; хромосомы; метафазная пластинка; цитогенетические препараты; хромосомные aberrации; клетки костного мозга; методика подготовки проб; доклинические исследования; крысы; *in vivo*; пробоподготовка

**Для цитирования:** Вернер А.О., Устинова Т.М., Венгерович Н.Г. Оптимизация методики приготовления цитогенетических препаратов при проведении метафазного анализа клеток костного мозга млекопитающих *in vivo*. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):295–303. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-295-303>

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Anna O. Verner   
Tatiana M. Ustinova   
Nikolai G. Vengerovich 

## Optimisation of a Cytogenetic Sample Preparation Procedure for *In Vivo* Metaphase Analysis of Mammalian Bone Marrow Cells

State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine,  
4 Lesoparkovaya St., Saint Petersburg 195043, Russian Federation

✉ Anna O. Verner; [gniivm\\_5@mil.ru](mailto:gniivm_5@mil.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Metaphase analysis is used to assess the mutagenicity of medicines, and its accuracy depends directly on the quality of cytogenetic preparations. Existing procedures for cytogenetic sample preparation require optimisation because of their time and labour intensiveness and potential for artefactual chromosome loss that leads to errors in the interpretation of analytical results.

**AIM.** This study aimed to optimise a cytogenetic sample preparation procedure for mammalian bone marrow cells for *in vivo* metaphase analysis.

**MATERIALS AND METHODS.** The study was performed in randomly bred male mice weighing 18–20 g. The authors prepared cytogenetic samples of bone marrow cells according to the procedures set forth in the Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Drugs (A.N. Mironov (ed.), 2012), and GOST 34659-2020, Methods for Testing the Impact of Chemical Products on the Human Body. Assessment of Chromosomal Aberrations in Bone Marrow Cells of Mammals, as described and with modifications. Sample preparation involved using Hanks' solution, sodium citrate and potassium chloride solutions, acetic acid, methyl alcohol, medium 199, HEPES, and Giemsa stain.

**RESULTS.** The authors conducted an experimental comparison of the characteristics of cytogenetic preparations of mammalian bone marrow cells for *in vivo* metaphase analysis prepared using several methods. The samples prepared in accordance with the Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Drugs exhibited the highest percentage of analysable metaphase plates, in comparison with those obtained using the other sample preparation procedures. The authors optimised the sample preparation conditions, including the composition of the hypotonic solution (0.56% KCl), the time of hypotonic treatment (20 min), the time of fixation (12 h), and the composition of the culture medium (liquid medium 199 with Hanks' salts and glutamine). The authors introduced a step of preliminary chromosome fixation with 6% acetic acid, which generally contributed to an increase in the proportion of analysable metaphase plates by reducing the scattering and sticking of chromosomes.

**CONCLUSIONS.** The authors presented a modified sample preparation procedure for cytogenetic preparations that, compared with the previous procedures, offers an increase in the percentage of analysable metaphase plates to 56%, a 12% rise in the percentage of full sets of chromosomes ( $n=40$ ), and a 2–10-hour reduction in the preparation time.

**Keywords:** metaphase analysis; chromosomes; metaphase plate; cytogenetic preparations; chromosomal aberrations; bone marrow cells; sample preparation procedure; preclinical studies; rats; *in vivo*; sample preparation

**For citation:** Verner A.O., Ustinova T.M., Vengerovich N.G. Optimisation of a cytogenetic sample preparation procedure for *in vivo* metaphase analysis of mammalian bone marrow cells. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):295–303. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-295-303>

**Funding.** The study was performed without external funding.

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Метафазный анализ клеток костного мозга млекопитающих широко применяется в доклинических исследованиях безопасности фармакологических субстанций и лекарственных препаратов<sup>1</sup> [1]. Данный метод позволяет выявить аберрации всех типов (хроматидные и хромосомные), что, в свою очередь, позволяет оценить степень мутагенности исследуемого вещества, определить зависимость «доза – эффект»<sup>2</sup>. Однако метафазный анализ имеет ряд недостатков: при его применении учитываются только структурные изменения хромосом, к исполнителям теста предъявляются высокие квалификационные требования, его автоматизация отсутствует. Сложности в проведении данного теста могут возникнуть уже на этапе приготовления цитогенетического препарата костного мозга, от качества которого зависит точность дальнейшего анализа. Важно, чтобы препарат содержал достаточное количество метафазных пластинок, хромосомы были равномерно распределены по стеклу и качественно окрашены.

В Российской Федерации утвержден ряд методических документов<sup>3</sup>, регламентирующих процедуру проведения теста. Существующие методики имеют различия в части рекомендаций по пробоподготовке препаратов, в том числе в них отсутствует детальное описание этапов приготовления препаратов, вместо чего представлены ссылки на публикации и методические рекомендации 1980–1990 гг.

Цель работы – оптимизация методики приготовления цитогенетических препаратов клеток костного мозга млекопитающих *in vivo* для метафазного анализа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На первом этапе было выполнено информационно-аналитическое сравнительное исследование методических руководств по приготовлению цитогенетических препаратов при проведении метафазного анализа клеток костного мозга млекопитающих *in vivo*, изложенных в монографии «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств»<sup>4</sup> (далее – Руководство) и ГОСТ 34659-2020 «Методы испытания по воздействию химической продукции

на организм человека. Оценка хромосомных аберраций в клетках костного мозга млекопитающих» (далее – ГОСТ 34659-2020). Вторым этапом исследования был направлен на оптимизацию пробоподготовки клеток костного мозга для проведения метафазного анализа на основе утвержденных методик с применением новых реактивов и методов.

**Биологические тест-системы.** В качестве тест-систем использовали беспородных мышесамцов весом 18–20 г. Животные были получены из ФГБУН НЦБМТ ФМБА России филиал «Электрогорский». Транспортировка, содержание и работа с животными проводились согласно ГОСТ 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организации процедур». В исследовании было использовано 60 мышей, которых распределяли на 10 групп по 6 животных случайным образом. Мышей содержали в помещении с относительной влажностью воздуха 60±10% при 12-часовом световом дне с неограниченным доступом к еде и воде<sup>5</sup>. Для кормления животных использовался полнорационный корм ЛБК-120 для крыс и мышей (ЗАО «Тосненский комбикормовый завод»).

Исследование было одобрено заседанием локальной биоэтической комиссии ФГБУ ГНИИИ ВМ МО РФ, протокол заседания № 15 от 17.12.2021, и соответствует гуманистическим и этическим нормам.

**Реактивы.** В исследовании использовали следующие реактивы: колхицин (НПП «ПанЭко»), раствор Хенкса (НПП «ПанЭко»), питательная среда 199 жидкая с солями Хенкса с глутамином (НПП «ПанЭко»); хлорид калия (АО «Ленреактив»); цитрат натрия (АО «Ленреактив»); метиловый спирт (х.ч., ООО ТД «ХИММЕД»), уксусная кислота ледяная (99,80%, ООО «НеваРеактив»), буферный раствор НЕРЕС 1М (Lonza), краситель Гимзы 10–12-кратный раствор (ООО «БиолоТ»).

**Подготовка предметных стекол.** Предметные стекла, применяемые для цитогенетических препаратов, готовили следующим способом: стекла обрабатывали теплым мыльным раствором, ополаскивали горячей водой и промывали в течение нескольких часов в проточной воде. Вымытые стекла помещали в хромовую смесь и выдерживали

<sup>1</sup> Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Женева: ВОЗ; 1989.

<sup>2</sup> Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

<sup>3</sup> Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. ГОСТ 34659-2020. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Оценка хромосомных аберраций в клетках костного мозга млекопитающих.

<sup>4</sup> Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

<sup>5</sup> ГОСТ 34659-2020. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Оценка хромосомных аберраций в клетках костного мозга млекопитающих.

в течение 24 ч. После этого их вновь промывали в проточной воде с последующим кипячением в дистиллированной воде в течение 30 мин. Чистые обезжиренные стекла помещали в свежую дистиллированную воду и выдерживали при температуре 4–8 °С в течение 1 сут, после чего влажные стекла использовали для приготовления цитогенетических препаратов<sup>6</sup>.

**Приготовление цитогенетических препаратов по методике ГОСТ 34659-2020.** Мышам вводили колхицин в дозе 4 мг/кг внутрибрюшинно. Через 1,5 ч животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации. Из бедренных костей вымывали красный костный мозг подогретым до 37 °С раствором Хенкса в объеме 1 мл. В пробирки с костным мозгом добавляли еще 2 мл теплого раствора Хенкса. Клетки осаждали при помощи центрифуги Eppendorf 5804R при 100 g в течение 10 мин. Полностью удаляли супернатант и добавляли 3 мл предварительно подогретого гипотонического раствора (0,9% раствор цитрата натрия), осторожно ресуспендировали и инкубировали на водяной бане при 37 °С в течение 13 мин. По завершении гипотонической обработки пробирки центрифугировали 10 мин при 160 g. Супернатант удаляли и осторожно добавляли 3 мл свежеприготовленного фиксатора Кларка, осадок не ресуспендировали. Фиксатор Кларка готовили из метанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1 (по объему) и использовали в течение 12 ч. Клетки костного мозга промывали фиксатором еще 2 раза. После последней смены фиксатора осадок аккуратно ресуспендировали, снимая его со стенок пробирки. Добавляли в каждую пробирку по каплям еще 4 мл фиксатора и оставляли на 12 ч при 4 °С. После выдержки центрифугировали пробирки при 160 g в течение 10 мин. Удаляли надосадочную жидкость и в пробирку к осадку добавляли по каплям 0,5 мл свежеприготовленного фиксатора при комнатной температуре, ресуспендировали. На охлажденные влажные предметные стекла наносили по 1–2 капли клеточной суспензии, держа пипетку перпендикулярно стеклу на высоте 15–20 см. Препараты высушивали на воздухе. Окраску проводили 10% раствором Гимзы в течение 10 мин при комнатной температуре.

**Приготовление цитогенетических препаратов по методике «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств».** За 1,5 ч до эвтаназии мышам вводили

внутрибрюшинно колхицин в дозе 4 мг/кг. Затем из бедренных костей 1 мл раствора Хенкса, подогретым до 37 °С, вымывали красный костный мозг. В пробирки с суспензией костного мозга добавляли еще 2 мл теплого раствора Хенкса. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 100 g, надосадочную жидкость полностью удаляли и медленно добавляли гипотонический раствор, встряхивая при этом пробирку для диспергирования осадка. В качестве гипотонического раствора применяли 1% раствор цитрата натрия либо 0,56% раствор KCl. Длительность гипотонической обработки применяемых растворов составляла 15 и 20 мин при комнатной температуре и при 37 °С соответственно. По окончании гипотонической обработки клетки центрифугировали, фиксировали путем добавления (по каплям) 3 мл свежеприготовленного фиксатора Кларка. Фиксацию проводили трехкратно. После последней фиксации пробирки центрифугировали, удаляли супернатант и к осадку добавляли 0,5 мл фиксатора, ресуспендировали. По 1–2 капли клеточной суспензии наносили на охлажденные влажные стекла с высоты 15–20 см и высушивали на воздухе. Препараты окрашивали 10% раствором красителя Гимзы 10 мин и промывали в дистиллированной воде с последующим высушиванием на воздухе.

**Модифицированная методика пробоподготовки.** С целью повышения эффективности пробоподготовки в методику были внесены следующие изменения:

- 1) клеточную взвесь после фиксации раскапывали на предметные стекла и помещали во влажную камеру на 2 ч<sup>7</sup> [2];
- 2) эффективность культивирования клеток повышали путем смены питательной среды – вместо раствора Хенкса использовали питательную среду 199 жидкую с солями Хенкса с глутамином (далее – среда 199). Для вымывания клеток костного мозга использовали среду 199, нагретую до 37 °С. В пробирки с клеточной взвесью добавляли среду 199 до 5 мл и культивировали в термостате при температуре 37 °С в течение 2 ч [3–5];
- 3) для двухступенчатой фиксации использовали два фиксатора: 6% раствор уксусной кислоты и фиксатор Кларка. Клетки, прошедшие гипотоническую обработку, фиксировали 3 мл 6% раствора уксусной кислоты в течение 2 мин при комнатной температуре без центрифугирования и в течение 5 мин при центрифугировании

<sup>6</sup> Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Женева: ВОЗ; 1989.

<sup>7</sup> Плагина КЛ. Разработка методики цитогенетического анализа ооцитов для генотоксикологической оценки лекарственных средств: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: 2018.

при 100 г. После удаления надосадочной жидкости проводили фиксацию клеток стандартным способом по методике<sup>8</sup> [6];

4) для улучшения разброса хромосом в метафазной пластинке применяли обработку буферным гипотоническим раствором (0,4% KCl с NEPEs) в течение 15–20 мин [3–5].

**Хромосомный анализ** проводили с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse Ci H550S (Япония) при увеличении объектива  $\times 20$  и  $\times 100$  с применением иммерсионного масла. Фоторегистрацию осуществляли при помощи цифровой фотокамеры Nikon DS-Fi3 с базовым программным обеспечением.

Основным критерием оценки цитогенетических препаратов, приготовленных по рекомендованным методикам, являлась доля метафазных пластинок, пригодных для анализа. Оценка хромосомных нарушений в клетках костного мозга выполняют путем анализа метафазных пластинок с модальным числом  $n=40$  (39–41), поэтому среди проанализированных метафаз отдельно учитывали долю метафаз с полным набором хромосом ( $n=40$ ) и метафаз с анеуплоидией ( $n<40$ ;  $n>40$ ). Также учитывали долю метафаз со слипшимися и разлетевшимися хромосомами среди непригодных для анализа метафазных пластинок.

**Статистическую обработку данных** проводили с использованием программы Statistica 10. При статистическом анализе для всех вариантов приготовления цитогенетических препаратов рассчитывали долю метафаз, доступных для анализа ( $P$ ), и стандартную ошибку доли ( $P-\Delta$ ;  $P+\Delta$ ). Для оценки результата использовали многофакторный дисперсный анализ. Результат между группами считали статистически значимым при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На качество препаратов влияют два основных фактора: гипотоническая обработка и фиксация материала. Целью гипотонической обработки является разрыв ядерной оболочки и связей между хромосомами, что позволяет им свободно распределяться по цитоплазме. От качества фиксации зависит количество хромосом в метафазной пластинке. Артефактная потеря хромосом в результате некачественной фиксации также приводит к уменьшению метафаз, пригодных для анализа.

Сравнимые методики в большей мере отличаются вариантами гипотонической обработки

и временем выдержки клеток костного мозга в растворе. В качестве фиксатора в обеих методиках используется фиксатор Кларка с разницей по времени воздействия. По методике ГОСТ 34659-2020 рекомендовано фиксировать клеточную взвесь в течение 12 ч, по методике Руководства – в пределах 2–3 ч. Результаты сравнения цитогенетических препаратов, приготовленных по разным методикам, представлены в *таблице 1*.

При сравнении методик приготовления цитогенетических препаратов выявлено статистически значимое снижение доли слипшихся метафазных пластинок при приготовлении препаратов с гипотонической обработкой 0,56% раствором KCl в течение 20 мин в соответствии с Руководством относительно образцов, подготовленных по методике ГОСТ 34659-2020. Препараты, приготовленные по методике ГОСТ 34659-2020, содержали малую долю доступных для анализа метафаз (39%). Слипанию хромосом могла способствовать гипотоническая обработка при 37 °С. При повышении температуры эффективность гипотонической обработки увеличивается, однако одновременно усиливается и слипание клеток из-за присутствия в костном мозге коллагена и жира. Кроме того, фиксатор Кларка может вызывать значительное сжатие клеток [7], а в данном случае фиксация проходила в течение длительного времени (12 ч). В результате несбалансированной комбинации гипотонической обработки и времени фиксации образуется малое количество доступных для анализа метафаз.

Фиксация препаратов, выполненных по Руководству, осуществлялась в течение 2–3 ч. Из рассмотренных вариантов гипотонической обработки наиболее эффективной является обработка 0,56% раствором KCl в течение 20 мин при комнатной температуре. Доля доступных метафазных пластинок в этом случае составила 51%. Существенным недостатком данной методики является ресуспендирование клеточного осадка на стадии первой фиксации, в момент, когда клетки уже прошли гипотоническую обработку, но еще не были зафиксированы, поэтому механическое перемешивание способствовало повышению доли разлетевшихся хромосом, а также повреждению их структуры.

Оптимальным вариантом гипотонической обработки, при которой регистрировали наибольшую долю доступных для анализа метафазных пластинок, является обработка 0,56% раствором

<sup>8</sup> Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

**Таблица 1.** Сравнение качества цитогенетических препаратов костного мозга мышей-самцов, приготовленных при разных вариантах гипотонической обработки**Table 1.** Comparison of the quality of cytogenetic samples of bone marrow cells of male mice prepared using different hypotonic treatments

Методика Procedure	Условия гипотонической обработки Hypotonic treatment conditions	Критерии оценки качества цитогенетических препаратов Quality assessment criteria for cytogenetic preparations					Время пробо- подготовки, ч Sample preparation time, h
		Доля метафазных пластинок Percentage of metaphase plates $n=100, P(P-\Delta; P+\Delta), \%$			Доля набора хромосом в проанализированных метафазах Percentage of chromosome sets in the analysed metaphases $P(P-\Delta; P+\Delta), \%$		
		Доступных для анализа Analysable	Недоступных для анализа Non-analysable		$(n=40)$	$(n<40; n>40)$	
			Слипшиеся хромосомы Sticky chromosomes	Разлетевшиеся хромосомы Scattered chromosomes			
ГОСТ 34659-2020* GOST 34659-2020	0,9% цитрат натрия при 37 °С, 13 мин 0.9% sodium citrate, 37 °C, 13 min	39 (0,295; 0,485)	46 (0,463; 0,657)	15 (0,08; 0,22)	69 (0,60; 0,78)	31 (0,22; 0,40)	~14
Руководство** Guidelines**	1% цитрат натрия 37 °С, 15 мин 1% sodium citrate, 37 °C, 15 min	41 (0,314; 0,506)	48 (0,382; 0,578)	11 (0,049; 0,171)	65 (0,557; 0,743)	35 (0,257; 0,443)	~6
	1% цитрат натрия, 20 мин 1% sodium citrate, 20 min	45 (0,354; 0,546)	42 (0,323; 0,517)	13 (0,064; 0,196)	68 (0,589; 0,771)	32 (0,229; 0,411)	
	0,56% KCl 37 °С, 15 мин 0.56% KCl, 37 °C, 15 min	44 (0,343; 0,537)	55 (0,453; 0,647)	11 (0,049; 0,171)	71 (0,621; 0,799)	29 (0,201; 0,379)	
	0,56% KCl, 20 мин 0.56% KCl, 20 min	51 (0,426; 0,594)	36*** (0,266; 0,454)	13 (0,064; 0,196)	76 (0,676; 0,844)	24 (0,156; 0,324)	
Модифицированная методика Modified procedure	Среда 199, префиксация Medium 199, preliminary fixation	56*** (0,468; 0,652)	35*** (0,257; 0,443)	9 (0,037; 0,143)	88**** (0,818; 0,944)	12*** (0,056; 0,184)	~4

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** P – доля;  $\Delta$  – стандартная ошибка доли; n – модальное число.

\* – ГОСТ 34659-2020 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Оценка хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих.

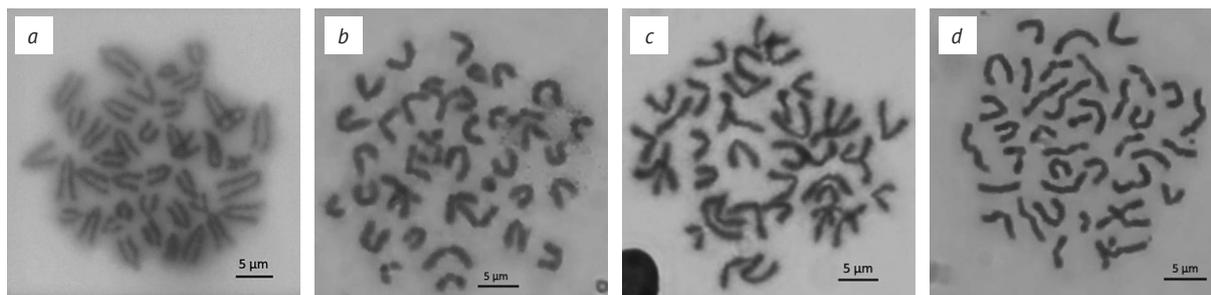
\*\* – Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

\*\*\* – данные имеют статистически значимые отличия в сравнении со значениями, полученными при выполнении цитогенетических препаратов по методике ГОСТ 34659-2020 при  $p<0,05$ .\*\*\*\* – данные имеют статистически значимые отличия в сравнении со значениями, полученными при выполнении цитогенетических препаратов по методике из Руководства (гипотоническая обработка 0,56% KCl, 20 мин) при  $p<0,05$ .**Note.** P, proportion;  $\Delta$ , standard error of the proportion; n, modal number.

\* GOST 34659-2020. Methods for Testing the Impact of Chemical Products on the Human Body. Assessment of Chromosomal Aberrations in Bone Marrow Cells of Mammals.

\*\* A.N. Mironov (ed.), Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Drugs. Part 1. Moscow: Grif and Co; 2012.

\*\*\* There is a statistically significant difference between these data and the data obtained for cytogenetic samples prepared according to GOST 34659-2020, with  $p<0.05$ .\*\*\*\* There is a statistically significant difference between these data and the data obtained for cytogenetic samples prepared according to the Guidelines (hypotonic treatment with 0.56% KCl for 20 min), with  $p<0.05$ .



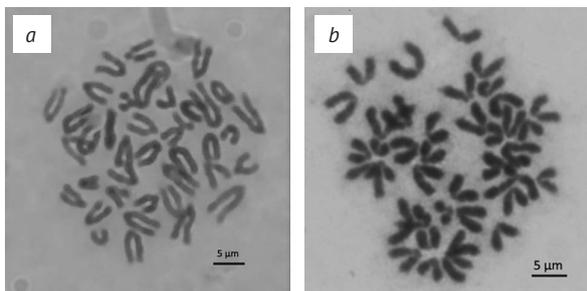
Фотографии выполнены авторами / The photos are taken by the authors

**Рис. 1.** Метафазные пластинки при обработке различными гипотоническими растворами: а, б – 0,56% раствор KCl; с, d – буферный гипотонический раствор (0,4% KCl с HEPES)

**Fig. 1.** Metaphase plates from cytogenetic preparations treated with various hypotonic solutions: a, b, 0.56% KCl; c, d, hypotonic buffer solution (0.4% KCl and HEPES)

KCl с выдержкой в течение 20 мин и последующей фиксацией смесью метанола и уксусной кислоты (3:1 об./об.) в течение 12 ч.

С целью улучшения качества цитогенетических препаратов были рассмотрены дополнительные условия пробоподготовки, такие как сушка препаратов во влажной камере, использование среды 199 и культивирование клеток костного мозга, использование буферного гипотонического раствора (0,4% KCl с HEPES), применение дополнительной фиксации клеток 6% раствором уксусной кислоты. При использовании буферного гипотонического раствора не было отмечено более выраженной диффузии хромосом по сравнению с обработкой 0,56% раствором KCl, при этом регистрировали высокую долю слипшихся хромосом, доля доступных для анализа метафаз при таких условиях обработки составила 52%. Результаты сравнения влияния гипотонической обработки на слипание хромосом в метафазных пластинках представлены на рисунке 1.



Фотографии выполнены авторами / The photos are taken by the authors

**Рис. 2.** Метафазные пластинки при различных условиях высушивания цитогенетических препаратов: а – сушка на воздухе при комнатной температуре; б – сушка во влажной камере

**Fig. 2.** Metaphase plates from cytogenetic preparations dried under various conditions: a, at room temperature and humidity; b, in a humidified chamber

Культивирование клеток в среде 199 после отбора позволило увеличить общее количество метафазных пластинок на стекле, но никак не повлияло на доступность для анализа.

Сушка препаратов во влажной камере способствовала укорачиванию плеч хромосом и более выраженной диффузии хромосом в метафазной пластинке (рис. 2). Несмотря на то что хромосомы расположены более диффузно, укорачивание плеч хромосом может негативно отразиться на качестве исследования из-за сложностей визуализации аберраций. Доля доступных для анализа пластинок в данном случае составила 53%. Фиксация с использованием 6% раствора уксусной кислоты позволила увеличить долю доступных для анализа метафаз до 56% (табл. 1). Повышение качества цитогенетических препаратов отмечали при использовании стадии культивирования клеток костного мозга в среде 199 и стадии дополнительной фиксации 6% раствором уксусной кислоты.

Суммировать описание модифицированной методики приготовления цитогенетических препаратов можно следующим образом:

- 1) ввести мышам внутривенно раствор колхицина в дозе 4 мг/кг за 1,5 ч до эвтаназии;
- 2) извлечь бедренные кости, промыть костный мозг 1 мл среды 199, нагретой до 37 °С. В пробирки с клеточной взвесью добавить еще 4 мл среды 199, после чего выдержать пробирки 1–2 ч при 37 °С;
- 3) после инкубации пробирки центрифугировать в течение 10 мин при 160 g, удалить супернатант и добавить 3 мл 0,56% раствора KCl, перемешать и оставить при комнатной температуре на 20 мин;
- 4) после гипотонической обработки клетки снова центрифугировать, удалить супернатант и фиксировать 6% раствором уксусной кислоты 2 мин при комнатной температуре, после чего

пробирки центрифугировать в течение 5 мин при 100 g;

5) дальнейшую фиксацию проводить раствором Кларка с двумя сменами фиксатора в течение 12 ч. При первой фиксации осадок не ресуспендировать. Между сменами фиксатора пробирки центрифугировать по 10 мин при 100 g;

6) после фиксации осадок разбавить в 0,5 мл фиксатора, аккуратно ресуспендировать и по 1–2 капли нанести на чистые охлажденные влажные стекла с высоты 15–20 см, держа пипетку перпендикулярно предметному стеклу;

7) высушить препараты при комнатной температуре;

8) поместить препараты в 10% раствор красителя Гимзы на 10 мин.

Таким образом, пробоподготовка по модифицированной методике (модификация условий гипотонической обработки и фиксации материала) позволила увеличить количество доступных для анализа пластинок по сравнению с количеством качественных пластинок, полученных по методике ГОСТ 34659-2020 (с 39 до 56%), а также увеличить количество метафаз с полным набором хромосом. Предложенная модификация методики позволяет сократить время приготовления препаратов на 10 ч по сравнению со способом, описанным в ГОСТ 34659-2020, и на 2 ч по сравнению с методикой из Руковод-

ства за счет уменьшения времени на фиксацию клеточной суспензии.

Описанная выше методика оригинальна и не повторяет методики, представленные ранее в научных статьях и методических руководствах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения исследований была экспериментально обоснована необходимость модификации методики приготовления цитогенетических препаратов костного мозга млекопитающих *in vivo*. Предложенная последовательность процедур пробоподготовки образцов метафазных пластинок имеет ряд преимуществ перед методиками, описанными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» и ГОСТ 34659-2020 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Оценка хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих», в том числе увеличение количества пригодных для анализа метафаз на 5%, увеличение доли хромосом с полным набором ( $n=40$ ) на 12% и сокращение времени, затрачиваемого на приготовление препаратов на 2–10 ч. Разработанная методика рекомендуется для использования в доклинических исследованиях *in vivo* для получения цитогенетических препаратов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Дурнев АД, Жанатаев АК. Актуальные аспекты генетической токсикологии лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(1):90–109. Durnev AD, Zhanataev AK. Relevant aspects of drug genetic toxicology. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(1):90–109 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-90-109>
2. Deng W, Tsao SW, Lucas JN. A new method for improving metaphase chromosome spreading. *Cytometry A*. 2003;51(1):46–51. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.10004>
3. Moralli D, Yusuf M, Mandegar MA. An improved technique for chromosomal analysis of human ES and iPS cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2011;7(2):471–7. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9224-4>
4. Liehr T, Weise A, Person L. How to obtain high-quality metaphase spreads for molecular cytogenetics. *Curr Protoc*. 2022;2(2):e392. <https://doi.org/10.1002/cpz1.392>
5. Новгородова ИП. Сравнительный анализ гипотонических растворов для цитогенетических исследований животных. *Аграрная наука*. 2021;(6):24–6. Novgorodova IP. Comparative analysis of hypotonic solutions for cytogenetic studies of animals. *Agrarian Science*. 2021;(6):24–6 (In Russ.). <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-350-6-24-26>
6. Овсепян ВА, Югов ЮИ. Способ приготовления препаратов метафазных хромосом из клеток костного мозга больных гемобластозами. Патент Российской Федерации № 2200318; 2000. Ovsepyan VA, Yugov Yul. Method for obtaining preparations of metaphase chromosomes out of bone marrow cells in hemoblastose-suffering patients. Patent of the Russian Federation No. 2200318; 2000 (In Russ.). EDN: [MMDIRO](https://www.edn.ru/2200318)
7. Буданцев АЮ, Демьянов АЮ. Деформация тканей в ходе гистологического процессинга. I. Методы морфометрической оценки деформаций. *Цитология*. 2017;59(5):362–8. Budantsev AYU, Demyanov AYU. Deformations during histological tissue processing. I. Methods for morphometric analysis of deformations. *Cytology*. 2017;59(5):362–8 (In Russ.). EDN: [YQGDZP](https://www.edn.ru/2200318)
8. Коненков ВИ, Королев МА, Чуринов АА. Изучение возможных мутагенных свойств нового лекарственного средства на основе комплекса лития, оксида алюминия и полиметилсилоксана. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019;39(5):62–7. Konenkov VI, Korolev MA, Churin AA. Studying the possible mutagenic properties of new medicine on the basis of complex lithium citrate, aluminum oxide and polymethylsiloxane. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2019;39(5):62–7 (In Russ.). <https://doi.org/10.15372/SSMJ20190507>
9. Долгова ЕВ, Николин ВП, Попова НА. Патологические изменения, возникающие в организме мышей,

- обработанных сочетанием циклофосфана и экзогенной ДНК. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(1):129–46.
- Dolgova EV, Nicolin VP, Popova NA. Pathological changes in mice treated cyclophosphamide and exogenous DNA. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(1):129–46 (In Russ.).  
EDN: [RUGRAJ](#)
10. Blumenthal AB, Dieden JD, Kapp LN, Sedat JW. Rapid isolation of metaphase chromosomes containing high molecular weight DNA. *J Cell Biol*. 1979;81(1):255–9.  
<https://doi.org/10.1083/jcd.81.1.255>
  11. Fukami M, Shima H, Suzuki E, Ogata T, Matsubara K, Kamimaki T. Catastrophic cellular events leading to complex chromosomal rearrangements in the germline. *Clin Genet*. 2017;91(5):653–60.  
<https://doi.org/10.1111/cge.12928>
  12. Mardin BR, Drainas AP, Waszak SM, Weischenfeldt J, Isokane M, Stütz AM, et al. A cell-based model system links chromothripsis with hyperploidy. *Mol Syst Biol*. 2015;11(9):828–40.  
<https://doi.org/10.15252/msb.20156505>
  13. Pacchierotti F, Stocchi V. Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse. *Methods Mol Biol*. 2013;1044:147–63.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-62703-529-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-529-3_7)

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.О. Вернер – идея, планирование и проведение экспериментальной части исследования, подбор и анализ литературы, написание и оформление рукописи; Т.М. Устинова – подбор и анализ литературы, редактирование текста рукописи, формулировка выводов; Н.Г. Венгерович – редактирование текста рукописи и утверждение окончательного варианта статьи.

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Anna O. Verner* conceived the idea of the study, designed and conducted the experiments, collected and analysed literature, drafted and designed the manuscript. *Tatiana M. Ustinova* collected and analysed literature, edited the manuscript, and formulated the conclusions. *Nikolai G. Vengerovich* edited the manuscript and approved the final version for publication.

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Вернер Анна Олеговна / Anna O. Verner**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1023-6060>

**Устинова Татьяна Михайловна**, канд. биол. наук / **Tatiana M. Ustinova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9579-9190>

**Венгерович Николай Григорьевич**, д-р мед. наук, доцент / **Nikolai G. Vengerovich**, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3219-341X>

Поступила 05.02.2024

После доработки 18.04.2024

Принята к публикации 18.06.2024

Received 5 February 2024

Revised 18 April 2024

Accepted 18 June 2024



И.И. Яичков<sup>1,2</sup> ✉   
А.Л. Хохлов<sup>2</sup>   
М.К. Корсаков<sup>1</sup>   
А.А. Шетнев<sup>1</sup>   
Н.Н. Вольхин<sup>1</sup>   
С.С. Петухов<sup>1,2</sup>

## Изучение фармакокинетики нового производного изоксазола на крысах с применением ВЭЖХ-МС/МС для анализа проб крови

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского», ул. Республиканская, д. 108/1, г. Ярославль, 150000, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Революционная, д. 5, г. Ярославль, 150000, Российская Федерация

✉ Яичков Илья Игоревич; [i.yaichkov@yspu.org](mailto:i.yaichkov@yspu.org)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Для изучения системной экспозиции селективного ингибитора карбоангидразы II типа производного изоксазола 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (TFISA) необходима оценка его фармакокинетических параметров в цельной крови, поскольку это соединение способно накапливаться в эритроцитах. Ранее биоаналитические методики для решения данной задачи разработаны не были.

**ЦЕЛЬ.** Разработка биоаналитической методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида в крови лабораторных животных и сравнение фармакокинетики глазной суспензии TFISA после однократной инстилляцией и внутривнутрибрюшинного введения крысам.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Количественное определение проводили методом высокоэффективной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием образцов крови крыс и кроликов. Хроматографическое разделение осуществляли с помощью колонки Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> (150×3,0 мм, 3,5 мкм) с применением 0,1% водного раствора муравьиной кислоты и метанола для градиентного элюирования. Масс-спектрометрическое детектирование выполняли в режиме мониторинга множественных реакций. Изучение фармакокинетики проводили на двух группах крыс линии Wistar по 6 особей (по 3 самца и 3 самки). Первой группе животных осуществляли инстилляцию 1% глазной суспензии TFISA в каждый глаз из расчета 3,7 мг/кг. Животным второй группы вводили этот же препарат внутривнутрибрюшинно в той же дозе. Образцы крови отбирали до введения препарата, а также спустя определенные временные интервалы после введения.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Разработана ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения TFISA и его метаболитов в крови лабораторных животных (кроликов и крыс). ВЭЖХ-МС/МС-методика полностью валидирована в соответствии с нормативными актами Евразийского экономического союза и требованиями руководства ICH M10. Аналитический диапазон определения TFISA в крови составил 20–20000, N-гидроксипроизводного – 2–2000, N-ацетилпроизводного – 0,1–100,0 нг/мл. Максимальная концентрация TFISA в крови после инстилляцией в глаз достигала 8173±1491, N-гидроксипроизводного – 695±271, N-ацетилпроизводного – 6,33±1,51 нг/мл. Период полувыведения TFISA при данном пути введения составил 58±10, N-гидроксипроизводного – 70±24, N-ацетилпроизводного – 14±3 ч. Биодоступность действующего вещества составила 90,18%.

**ВЫВОДЫ.** Разработанная биоаналитическая методика определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (TFISA) и его метаболитов в крови лабораторных животных была успешно использована для анализа образцов цельной крови крыс. В ходе исследования фармакокинетики глазной суспензии данного соединения выявлен длительный период полувыведения действующего вещества и его метаболитов, а также высокая относительная биодоступность.

**Ключевые слова:** ВЭЖХ-МС/МС; tandemная масс-спектрометрия; кровь; валидация; фармакокинетика; ингибитор карбоангидразы II, N-гидроксисульфонамид; доклинические исследования; методика определения; период выведения; биодоступность

**Для цитирования:** Яичков И.И., Хохлов А.Л., Корсаков М.К., Шетнев А.А., Вольхин Н.Н., Петухов С.С. Изучение фармакокинетики нового производного изоксазола на крысах с применением ВЭЖХ-МС/МС для анализа проб крови. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):304–316. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316>

**Финансирование.** Грант Российского научного фонда № 22-13-20085.

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ilya I. Yaichkov<sup>1,2</sup>   
Alexander L. Khokhlov<sup>2</sup>   
Mikhail K. Korsakov<sup>1</sup>   
Anton A. Shetnev<sup>1</sup>   
Nikita N. Volkhin<sup>1</sup>   
Sergey S. Petukhov<sup>1,2</sup> 

## Pharmacokinetics Study of a New Isoxazole Derivative in Rats Using HPLC-MS/MS for Blood Sample Analysis

<sup>1</sup> Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky, 108/1 Respublikanskaya St., Yaroslavl 150000, Russian Federation

<sup>2</sup> Yaroslavl State Medical University, 5 Revolutsionnaya St., Yaroslavl 150000, Russian Federation

✉ Ilya I. Yaichkov; [i.yaichkov@yspu.org](mailto:i.yaichkov@yspu.org)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Systemic exposure studies of a selective carbonic anhydrase II inhibitor, the isoxazole derivative 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (TFISA), require evaluating its pharmacokinetics in whole blood because the compound can accumulate in erythrocytes. Currently, no bioanalytical procedures have been developed to achieve this.

**AIM.** This study aimed to develop a bioanalytical procedure for the determination of TFISA and its metabolites (N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide) in the blood of laboratory animals and compare the pharmacokinetics of TFISA ophthalmic suspension in rats after a single ocular or intraperitoneal administration.

**MATERIALS AND METHODS.** The quantitative determination was performed by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) using rat and rabbit blood samples. The chromatographic separation used a Zorbax Eclipse Plus C18 column (150×3.0 mm, 3.5 μm) and a gradient elution system of 0.1% aqueous formic acid and methanol. The multiple reaction monitoring mass spectrometry mode was used for detection. The pharmacokinetics study was conducted in 2 groups of 6 Wistar rats (3 males and 3 females per group). Group 1 received an instillation of 1% TFISA ophthalmic suspension in each eye at a dose of 3.7 mg/kg. Group 2 received an intraperitoneal injection of the same product at the same dose. Blood samples were collected at baseline and at several intervals after administration.

**RESULTS.** The authors developed a bioanalytical procedure for the determination of TFISA and its metabolites in the blood of laboratory animals (rabbits and rats). This HPLC-MS/MS procedure was fully validated in accordance with the requirements of the EAEU legislation and the ICH M10 guideline. The analytical ranges in blood were 20–20000 for TFISA, 2–2000 for the N-hydroxy metabolite, and 0.1–100.0 ng/mL for the N-acetyl metabolite. The maximum blood levels after ocular instillation (mean±SD) were 8173±1491 for TFISA, 694±271 for the N-hydroxy metabolite, and 6.33±1.51 ng/mL for the N-acetyl metabolite. The half-lives for this route of adminis-

tration were  $58 \pm 10$  (TFISA),  $70 \pm 24$  (N-hydroxy metabolite), and  $14 \pm 3$  h (N-acetyl metabolite). The bioavailability of TFISA was 90.18%.

**CONCLUSIONS.** The developed and validated bioanalytical procedure for the determination of TFISA and its metabolites in the blood of laboratory animals has been successfully applied to samples of rat whole blood. According to the study of ophthalmic suspension pharmacokinetics, TFISA and its metabolites have long half-lives and high bioavailability.

**Keywords:** HPLC-MS/MS; tandem mass spectrometry; blood; validation; pharmacokinetics; carbonic anhydrase II inhibitor; N-hydroxysulfonamide; preclinical studies; assay; excretion period; bioavailability

**For citation:** Yaichkov I.I., Khokhlov A.L., Korsakov M.K., Shetnev A.A., Volkhin N.N., Petukhov S.S. Pharmacokinetics study of a new isoxazole derivative in rats using HPLC-MS/MS for blood sample analysis. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):304–316. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316>

**Funding.** Russian Science Foundation grant No. 22-13-20085.

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

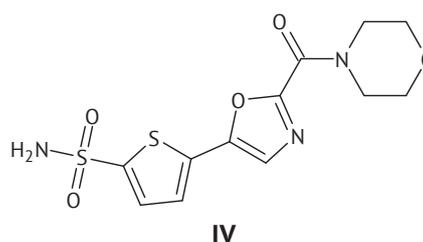
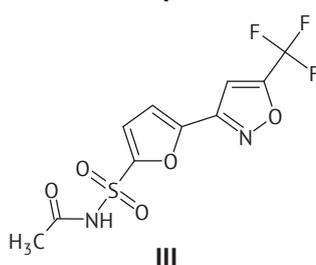
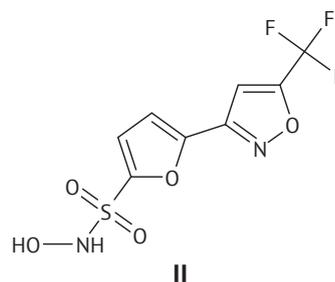
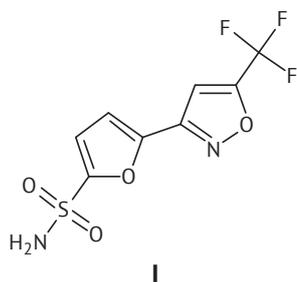
## ВВЕДЕНИЕ

Ингибиторы карбоангидразы (КА) – лекарственные средства (ЛС), механизм действия которых основан на связывании с ионом цинка, находящимся в активном центре этого фермента. Такие ЛС широко применяют в офтальмологии для терапии открытоугольной глаукомы, характерным симптомом которой является повышенное внутриглазное давление. Терапевтический эффект при этом вызван уменьшением секреции внутриглазной жидкости в переднюю камеру глаза благодаря снижению активности КА II типа [1].

Первые препараты системного действия (ацетазоламид, метазоламид и этосоламид) блокировали все изоформы КА, тем самым вызывая множественные нежелательные лекарственные реакции [1]. В настоящее время широко используют селективные ингибиторы КА II типа бринзоламид и дорзоламид, обладающие местным действием, которые производят, в том числе в форме глазной суспензии. Это значительно

снижает частоту и тяжесть побочных эффектов [2]. Новое соединение данной группы 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (TFISA) (I) в виде 1% суспензии по своей фармакологической активности и продолжительности действия превосходит разработанные ранее ЛС [3]. В процессе биотрансформации данного соединения образуются два метаболита: N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M1) (II) и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M2) (III).

Бринзоламид [4], дорзоламид [5], а также близкий по структуре к изучаемому действующему веществу 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамид [6] при инстилляции в глаз способны попадать в системный кровоток. Поэтому в рамках данного исследования предусмотрено определение относительной биодоступности субстанции TFISA. Все представители группы ингибиторов КА способны накапливаться в эритроцитах [4–6], поэтому



при доклиническом изучении суспензии TFISA целесообразно определение фармакокинетических констант действующего вещества и его метаболитов в крови лабораторных животных в дополнение к рекомендованному в нормативной документации исследованию плазмы крови<sup>1</sup>. Аналогичный подход к проведению фармакокинетических исследований характерен для циклоспорина А [7], такролимуса [8], эверолимуса [9], индапамида [10], финголимода [11]. В качестве биологического объекта для определения концентрации данных анализов также выбрана цельная кровь.

Биоаналитические методики для измерения концентрации TFISA и его метаболитов ранее разработаны не были. Дополнительной задачей при разработке методики является предотвращение разложения N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида, способного окисляться с образованием 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфоновой кислоты [6, 12]. Так, в исследовании фармакокинетики 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида, который также метаболизируется путем N-гидроксилирования сульфонамидной группы, для данных целей был использован 10% водный раствор тиосульфата натрия, который добавляли к К<sub>3</sub>ЭДТА-крови в объемном соотношении 1:1 [6].

Цель работы – разработка биоаналитической методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида в крови лабораторных животных и сравнение фармакокинетики глазной суспензии TFISA после однократной инстилляции и внутрибрюшинного введения крысам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Активная субстанция 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его глазная суспензия разработаны и произведены в Центре трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ЯГПУ им. К.Д. Ушинского. Состав исследуемой суспензии: TFISA – 50 мг, карбопол 974 – 20 мг, твин-80 – 2,5 мг, маннитол – 165 мг, 10% раствор натрия гидроксида до pH 7,5–8,5, 0,9% раствор натрия хлорида – до 5 мл. Данная субстанция находится на стадии доклинического исследования. Изучение фармакокинетики действующего вещества проводили на лабораторной серии суспензии.

В работе использовали метанол (LiChrosolv hypergrade for LC–MS, Merck KGaA) и муравьиную

кислоту (Optima LC–MS-Grade, Thermo Fisher Scientific), пригодные для ВЭЖХ-МС-анализа для приготовления подвижной фазы. Деионизированную воду получали с помощью установки Arrium Mini (Sartorius AG).

В работе использованы субстанции, синтезированные в Центре трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ЯГПУ им. К.Д. Ушинского: 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (99,1%), N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (98,2%) (M1), N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (98,5%) (M2), 5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамид (THSA) (IV) (98,3%) – внутренний стандарт (BC). Структура и чистота данных соединений охарактеризованы методами ЯМР-спектроскопии, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и газовой хроматографии. Это позволило использовать их в качестве стандартных образцов определяемых веществ.

Исходные растворы анализов и внутреннего стандарта с концентрацией 1000 мкг/мл готовили в диметилсульфоксиде (х.ч., АО «Ленреактив»), рабочие растворы – в метаноле (режим хранения – не выше +4 °С).

Исследование проводили с помощью ВЭЖХ-МС/МС-системы, включающей в себя tandemный масс-спектрометрический детектор QTRAP 5500 (AB Sciex) и хроматограф 1260 Infinity (Agilent Technologies) с бинарным насосом G1312B, автодозатором G1329B с внешним термостатом G1330B, термостатом колонок G1316A. Для управления прибором использовано программное обеспечение Analyst 1.6.2, для интегрирования полученных хроматограмм – MultiQuant 3.0.5 (AB Sciex).

Хроматографическое разделение осуществляли в градиентном режиме на колонке Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> (150×3,0 мм, 3,5 мкм) с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> (12,5×2,1 мм, 5,0 мкм) (Agilent Technologies) при скорости потока 0,6 мл/мин и температуре термостата 40 °С. Динамика изменения соотношения компонентов подвижной фазы: 0,1% водного раствора муравьиной кислоты (А) и метанола (В), представлена в *таблице 1*.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) (*табл. 2*). Количественные MRM-переходы использовали для количественного определения анализов, контрольные

<sup>1</sup> Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

MRM-переходы — для дополнительного подтверждения правильности идентификации. MRM-переход внутреннего стандарта THSA 342→78  $m/z$  с более интенсивным сигналом применяли для расчета концентрации TFISA, MRM-переход 342→110  $m/z$  с менее интенсивным сигналом — для расчета концентрации M1 и M2. Для ионизации элюата использовалось электрораспыление: полярность отрицательная, напряжение — 4500 В; температура источника ионов — 700 °С.

Для подготовки проб крови применяли осаждение белков и форменных элементов: к 20 мкл крови лабораторного животного добавляли 200 мкл метанольного раствора THSA с концентрацией 500 нг/мл, смесь перемешивали, добавляли 10 мкл 1% водного раствора муравьиной кислоты и снова перемешивали. Пробу центрифугировали (Heraeus Multifuge X3R, Thermo Fisher Scientific) 5 мин при 10000 об./мин. Надосадочная жидкость вводилась в хроматографическую систему.

Калибровочные образцы (К1–К8), образцы контроля качества (нижний предел количественного определения (НПКО), нижний, средний и верхний

уровни концентрации) и образцы для теста разведения (Dil) готовили путем добавления к 95 мкл крови лабораторного животного 5 мкл комбинированного рабочего раствора аналитов соответствующего уровня концентрации. Концентрация аналитов в комбинированном рабочем растворе аналитов в 20 раз превышала их концентрацию в соответствующем образце (табл. 3).

Валидацию разработанной методики проводили согласно требованиям Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов<sup>2</sup> и руководства ICH M10<sup>3</sup> по следующим показателям:

- селективность;
- градуировочная кривая;
- правильность и прецизионность внутри серии (по 2 серии на образцах биоматериала крысы и кролика) и между сериями;
- эффект разведения образца (двукратное разведение);
- эффект матрицы (расчет относительного стандартного отклонения (*RSD*), нормализованного фактора матрицы и правильности и прецизионности измерений на нижнем (*LQC*) и верхнем (*HQC*) уровнях концентрации);

Таблица 1. Условия градиентного элюирования

Table 1. Gradient elution conditions

Время, мин <i>Time, min</i>	0,1% водный раствор муравьиной кислоты (А), % <i>0.1% aqueous formic acid (A), %</i>	Метанол (В), % <i>Methanol (B), %</i>
0,0–0,5	65	35
2,0–5,0	65→35	35→65
5,0–5,1	35→10	65→90
5,1–7,0	10	90
7,0–7,1	10→65	90→35
7,1–8,0	65	35

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Таблица 2. Параметры масс-спектрометрического детектирования в режиме мониторинга множественных реакций

Table 2. Parameters of mass spectrometric detection in the multiple reaction monitoring mode

MRM-переходы, $m/z$ <i>MRM-transitions, <math>m/z</math></i>							
TFISA		M1		M2		THSA	
количественный <i>quantitative</i>	контрольный <i>control</i>	количественный <i>quantitative</i>	контрольный <i>control</i>	количественный <i>quantitative</i>	контрольный <i>control</i>	BC для TFISA <i>IS for TFISA</i>	BC для M1, M2 <i>IS for M1 and M2</i>
281→136	281→66	297→136	297→66	323→136	323→66	342→78	342→110

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** MRM — мониторинг множественных реакций, TFISA — 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 — N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 — N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; THSA — 5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамид; BC — внутренний стандарт.  
**Note.** MRM, multiple reaction monitoring; TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; THSA, 5-[2-(morpholine-4-carbonyl)-1,3-oxazole-5-yl]-thiophene-2-sulfonamide; IS, internal standard.

<sup>2</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

<sup>3</sup> ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. EMA/CHMP/ICH/172948/2019. EMA; 2022.

- перенос аналитов и ВС из предыдущей пробы;
- стабильность (краткосрочная стабильность (STS) (цельная кровь); долгосрочная стабильность (LTS) (цельная кровь); стабильность после 3 циклов заморозки/разморозки (FTS) (цельная кровь); стабильность приготовленных проб в автодозаторе (ASS));
- воспроизводимость при повторном введении аналитической серии.

Образцы НПКО, нижнего, среднего и верхнего уровня концентраций, а также Dil готовили в 6 повторностях для каждого испытания, калибровочные образцы – в одной повторности.

Для первоначальной оценки фармакокинетических параметров в крови в рамках данного исследования выбраны крысы, так как этот вид является наиболее доступной экспериментальной моделью [13, 14]. При выявлении высоких концентраций TFISA и его метаболитов в крови эксперимент может быть проведен также на втором виде животных-негрызунов – кроликах, поэтому методику разрабатывали для измерения концентрации аналитов в крови обоих видов животных.

Холостые образцы крови крыс линии Wistar массой более 500 г отбирали из яремной вены, холостые образцы крови кроликов породы Советская шиншилла массой более

3 кг – из ушной вены (все животные – питомник ООО «СМК Стезар»). Для данных целей использовали пробирки Improvacuter объемом 3 мл (Guangzhou Improve Medical Instruments Co.).

Оценку селективности и матричных эффектов проводили отдельно для каждого вида животных. Образцы контроля качества и холостые образцы готовили с применением крови, полученной от 6 разных животных, включая цельную и размороженную кровь. На основании результатов проведенных испытаний дизайн валидации был оптимизирован и количество серий по определению правильности и прецизионности сокращено до 2 для каждого биологического вида (крысы и кролики). Стабильность аналитов изучали только на образцах крови крыс, так как в ходе предварительного подбора антикоагулянта различий между матрицами не установлено.

Исследование фармакокинетики 1% суспензии 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида проводили на двух группах крыс линии Wistar по 6 особей (по 3 самца и 3 самки, питомник ООО «СМК Стезар»). Первой группе животных (масса 216±26 г ( $M \pm SD$ )) проводили инстилляцию лекарственного препарата из расчета 40 мкл в каждый глаз, что соответствовало дозе 3,7 мг/кг (в расчете на среднюю массу животных в группе):

**Таблица 3.** Концентрации 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в модельных образцах крови крысы

**Table 3.** Concentrations of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in spiked samples of rat blood

Аналит Analyte	Содержание в калибровочных образцах, нг/мл Analyte concentration in calibration samples, ng/mL							
	K1 (НПКО) (LLOQ)	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
TFISA	20	100	500	2000	5000	10000	15000	20000
M1	2	10	50	200	500	1000	1500	2000
M2	0,1	0,5	2,5	10,0	25,0	50,0	75,0	100,0
Аналит Analyte	Содержание в образцах контроля качества, нг/мл Analyte concentration in quality control samples, ng/mL							
	Нижний уровень концентрации LQC		Средний уровень концентрации MQC		Верхний уровень концентрации HQC		Dil	
TFISA	60		7500		17500		35000	
M1	6		750		1750		3500	
M2	0,3		37,5		87,5		175	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; НПКО – нижний предел количественного определения; Dil – образцы для теста разведения.

**Note.** TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; LLOQ, lower limit of quantification; LQC, low concentration quality control sample; MQC, middle concentration quality control sample; HQC, high concentration quality control sample; Dil, samples for the dilution integrity test.

Второй группе (масса  $230 \pm 32$  г ( $M \pm SD$ )) вводили изучаемую суспензию внутривенно в дозе 3,7 мг/кг. Данный способ выбран для оценки относительной биодоступности ввиду нерастворимости действующего вещества в воде. Использование двух параллельных групп животных обосновано длительным периодом полувыведения TFISA и его основного метаболита М1. Рандомизацию испытуемых не проводили. Отбор проб крови выполняли до введения препарата, а также через 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 48; 72; 144; 216 ч после введения в объеме 0,2 мл. Для данных целей использовали капиллярные пробирки Impromini (Guangzhou Improve Medical Instruments Co.), содержащие смесь натрия фторид и калия оксалата. Затем аликвоту цельной крови объемом 50 мкл замораживали до температуры не выше  $-70$  °С (морозильная камера MELING DV-HL218).

Исследование одобрено этическим комитетом ЯГПУ им. К.Д. Ушинского (протокол № 2 от 10.10.2023).

Фармакокинетические параметры изучаемых соединений рассчитывали с применением программного пакета R v. 3.3.2 (модуль Bear v. 2.7.7) (R-Project): оценены максимальная концентрация аналита в крови ( $C_{max}$ ), время наступления максимальной концентрации аналита в крови ( $T_{max}$ ), площадь под фармакокинетической кривой начиная с момента приема препарата до времени последнего отбора крови ( $AUC_{0-t}$ ), площадь под фармакокинетической кривой начиная с момента приема препарата до бесконечности ( $AUC_{0-\infty}$ ), константа элиминации ( $K_{el}$ ), период полувыведения аналита ( $T_{1/2}$ ), среднее время удержания аналита в крови (MRT); использован некомпартментный подход.

Программное обеспечение Statsoft Statistica 10.0.1011 использовано для расчета показателей описательной статистики: среднего арифметического ( $M$ ), стандартного отклонения ( $SD$ ), относительного стандартного отклонения ( $RSD$ ), стандартной ошибки среднего ( $SEM$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подобранные условия хромато-масс-спектрометрического определения позволили достичь высокого уровня чувствительности для определения каждого аналита. Выбранная программа градиентного элюирования (табл. 1) позволила надежно разделить TFISA и его ацетилированный метаболит М2 (разрешение между пиками  $>5$ ), который подвержен фрагментации

в процессе ионизации до исходного иона действующего вещества. Это обеспечило требуемую селективность разработанной методики.

На следующей стадии исследования осуществляли выбор антикоагулянта путем оценки краткосрочной стабильности (24 ч на холоде элементе со льдом), стабильности приготовленных проб в автосэплере (24 ч при  $+4$  °С), стабильности после 3 циклов заморозки/разморозки (FTS) основного метаболита N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида. При этом использовали свежую цельную кровь и размороженную кровь, хранившуюся в течение 1 месяца в морозильной камере при температуре не выше  $-70$  °С. Необходимость такого эксперимента обусловлена возможным снижением активности антиоксидантных систем эритроцитов в процессе хранения. В качестве антикоагулянтов применяли  $K_3$ ЭДТА, гепарин лития и натрия фторид / калия оксалат ( $NaF/K_2C_2O_4$ ). На начальном этапе анализировали по 2 пробы цельной и гемолизированной крови с добавлением каждого антикоагулянта и комбинированного рабочего раствора аналитов с концентрацией на уровне НQC: 1 проба — из крови крысы, 1 проба — из крови кролика. Для осаждения белков и форменных элементов применяли только метанольный раствор THSA. Расчеты осуществляли методом внешнего стандарта относительно свежеприготовленного образца.

Результаты определения STS и FTS с использованием гепарина лития и смеси  $NaF/K_2C_2O_4$  соответствовали допустимому диапазону 85–115%<sup>4</sup> от номинального значения концентрации М1. При хранении проб в автосэплере наблюдали разложение N-гидрокси-метаболита при применении всех антикоагулянтов, но при применении комбинации  $NaF/K_2C_2O_4$  оно было наименьшим. Данный антикоагулянт был выбран для дальнейшего подтверждающего исследования, в ходе которого анализировали по 6 проб цельной и гемолизированной крови с добавкой аналитов: 3 пробы — из крови крысы, 3 пробы — из крови кролика. Для стабилизации М1 к пробам после осаждения компонентов матрицы метанолом добавляли 1% водный раствор муравьиной кислоты, как и в работе [6] для стабилизации близкого по структуре N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида. Полученные результаты соответствовали установленным требованиям<sup>5</sup> (рис. 1 «Результаты изучения стабильности N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-

<sup>4</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».  
ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. 2022.

<sup>5</sup> Там же.

оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида в крови с применением различных антикоагулянтов», опубликован на сайте журнала<sup>6</sup>).

После выбора антикоагулянта и условий пробоподготовки проведена полная валидация разработанной методики (табл. 4, 5). Оценка селективности определения изучаемых соединений и внутреннего стандарта выполнена совместно с испытанием внутрисерийной прецизионности и правильности (табл. 6 «Результаты оценки внутрисерийной правильности и прецизионности методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в крови лабораторных животных», опубликована на сайте журнала<sup>7</sup>). Площадь хроматографических пиков TFISA, M1 и M2 на хроматограммах холостых образцов крови крыс и кроликов не превышала 20%, площадь хроматографического пика THSA – 5% от площади хроматографических пиков данных веществ в соответствующих образцах с концентрацией НПКО (рис. 2 «Примеры хроматограмм холостого образца крови крысы и образца на уровне нижнего предела количественного применения», опубликован на сайте журнала<sup>8</sup>). Калибровочные зависимости, которые строили по соотношениям площадей хроматографических пиков «аналит/THSA», носили линейный характер. Угловые и свободные коэффициенты градуировочных кривых были близки для образцов крови обоих видов животных.

Изучение матричных эффектов проводили двумя способами. По первому способу осуществляли расчет коэффициента вариации нормализованного фактора матрицы (NMF)<sup>2</sup>. Его величина составляла 1,91–8,75% для каждого изучаемого соединения в крови крыс и кроликов и не превышала максимально допустимые 15%. Значение NMF анализов в крови у обоих видов животных при этом близкие: 0,872–0,908 – для TFISA, 0,836–0,884 – для M1, 0,887–0,922 – для M2. Максимальная разница между NMF составляла 5,43% (для M1), что значительно меньше 15%. Это позволяет объединить результаты аналитических серий, выполненных на образцах крови крысы и кролика, при оценке межсерийной прецизионности и правильности. Оценка матричных эффектов вторым способом проводили путем расчета относительной погрешности ( $\delta$ ) и RSD на нижнем и верхнем уровнях концентраций (табл. 6, опубликована

на сайте журнала<sup>9</sup>). Величина  $\delta$  в случае каждого аналита укладывалась в диапазон  $-9,83 \div 10,36\%$ , RSD не превышало 9,30%, что соответствовало установленным требованиям<sup>10</sup>.

Правильность и прецизионность методики изучали путем анализа 4 аналитических серий: по 2 серии на образцах крови крыс и кроликов (табл. 5, 6). Средние значения  $\delta$  каждого аналита входили в установленный диапазон  $\pm 15\%$  в образцах нижнего, среднего и верхнего уровней концентрации, значения RSD для каждого уровня не превышала 15%. Для НПКО-проб величина  $\delta$  для TFISA, M1 и M2 составляла  $\pm 20\%$ , величина RSD была менее 20% (табл. 6, опубликована на сайте журнала<sup>11</sup>). Результаты межсерийного сравнения также входили в указанные выше допустимые диапазоны (табл. 5). При двукратном разведении проб крови с концентрацией Dil относительная погрешность определения для TFISA составила 7,95%, для M1 – 6,48%, для M2 – 6,87%, что соответствовало критериям приемлемости. Перенос TFISA из предыдущей пробы в холостой образец не превышал 20% от уровня образца НПКО, перенос остальных аналитов и внутреннего стандарта из предыдущей пробы отсутствовал.

В ходе валидации подтверждена краткосрочная стабильность, стабильность после 3 циклов заморозки/разморозки, долгосрочная стабильность при температуре не выше минус 70 °С в течение 30 сут, стабильность приготовленных проб в автодозаторе (табл. 7): отклонение рассчитанных концентраций аналитов от номинальных значений не превышало  $\pm 15\%$ . Для испытаний использовали только образцы крови крыс ввиду отсутствия различий в матричных эффектах и приемлемых результатов предварительных испытаний, выполненных на биологических объектах обоих видов. При повторном анализе серии спустя 72 ч величина относительной погрешности измерений аналитов входила в диапазон  $-0,49 \div 9,09\%$ , а величина RSD на каждом уровне концентраций  $-2,09 \div 12,95\%$  (табл. 5). Таким образом, выбранный антикоагулянт предотвратил разложение M1 при хранении образцов крови, а добавление 1% раствора муравьиной кислоты обеспечило стабильность приготовленных проб в автодозаторе.

Исследование фармакокинетики 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида

<sup>6</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-fig1>

<sup>7</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-table6>

<sup>8</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-fig2>

<sup>9</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-table6>

<sup>10</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. 2022.

<sup>11</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-table6>

**Таблица 4.** Результаты оценки правильности и прецизионности методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в крови лабораторных животных (основные параметры валидации)

**Table 4.** Accuracy and precision evaluation results for the method for the determination of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in the blood of laboratory animals (main validation parameters)

Испытание Test		TFISA	M1	M2
Калибровочная зависимость Calibration function		Линейная Linear	Линейная Linear	Линейная Linear
Весовой коэффициент Weighting factor		1/x <sup>2</sup>	1/x	1/x
Аналитический диапазон, нг/мл Analytical range, ng/mL		20–20000	2–2000	0,1–100
Угловые коэффициенты калибровочных кривых (мин.-макс.) Slopes of calibration curves (min.-max.)	Крыса Rat	0,00062–0,00070	0,0085–0,0010	0,0395–0,0464
	Кролик Rabbit	0,00063–0,00069	0,0086–0,0010	0,0410–0,0452
Свободные коэффициенты калибровочных кривых (мин.-макс.) Intercepts of calibration curves (min.-max.)	Крыса Rat	0,0016–0,0019	0,0012–0,0018	0,099–0,0151
	Кролик Rabbit	0,0015–0,0018	0,0010–0,0015	0,0102–0,0140

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; x – концентрация.

**Note.** TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; x, concentration.

в форме 1% глазной суспензии проводили с использованием валидированной методики. Рассчитанные значения фармакокинетических параметров TFISA, M1 и M2 после инстилляционной лекарственной препарата в глаз и его внутрибрюшинного введения представлены в таблице 8, их фармакокинетические профили – на рисунке 3.

Величина максимальной концентрации TFISA в крови составила ~8 мкг/мл после глазной инстилляционной (OI) и ~11,6 мкг/мл после внутрибрюшинной инъекции (IP). Значения  $AUC_{0-t}$  данного соединения при обоих способах введения достаточно близкие, величина относительной биодоступности действующего вещества – 90,2% (табл. 8). Период полувыведения TFISA достаточно длительный – около 58 ч (OI) и 61 ч (IP) и сопоставимый при двух изученных путях введения.

Фармакокинетический профиль основного метаболита M1 после закапывания суспензии в глаз характеризовался медленным нарастанием концентрации данного анализа до величины ~0,7 мкг/мл к ~7,7 ч после введения и медленным ее снижением (рис. 3). При внутрибрюшинном способе введения детектирован более высокий уровень  $C_{max}$  данного метаболита – ~1,6 мкг/мл, достигнутый значительно быстрее – через 1,8 ч после введения. Длительность периода полувыведения M1 после инстилляционной составила ~70 ч, а после инъекции в брюшную полость – ~93 ч. N-гидроксипроизводное имело близкие значения

$AUC_{0-t}$  при обоих способах введения (табл. 8). Это может быть связано с более медленным перераспределением действующего вещества из эритроцитов в плазму после закапывания в глаз, что привело к более продолжительному образованию и элиминации M1. При инъекции, вероятно, TFISA сразу в большом количестве проникает в плазму, из которой легче попадает в гепатоциты, поэтому в первые часы после внутрибрюшинного введения TFISA подвергается более интенсивной биотрансформации.

Концентрации N-ацетилпроизводного в крови значительно ниже концентраций TFISA, N-гидроксипроизводного. Так, при инстилляционной ЛС в глаз  $C_{max}$  достигает ~6,4 нг/мл, а при внутрибрюшинной инъекции – ~19,0 нг/мл. Величина  $T_{max}$  M2 (2,4 ч (OI) и 1,7 ч (IP)) при обоих способах введения близка к  $T_{max}$  TFISA (2,8 ч (OI) и 1,3 ч (IP)). Период полувыведения M2 меньше, чем TFISA и M1. При этом его величина после закапывания изучаемого препарата в глаз меньше, чем после инъекции в брюшную полость: ~14,5 ч (OI) и ~17,6 ч (IP). При внутрибрюшинном введении также получено более высокое значение  $AUC_{0-t}$ , которое приблизительно в 2 раза превосходит  $AUC_{0-t}$  (OI) (табл. 7). Удлинения фазы снижения концентрации на фармакокинетическом профиле M2 за счет его накопления после инстилляционной суспензии TFISA также не наблюдали (рис. 3). Это свидетельствует о более быстром выводе данного метаболита из системного кровотока.

**Таблица 5.** Результаты оценки правильности и прецизионности методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в крови лабораторных животных (дополнительные параметры валидации)**Table 5.** Accuracy and precision evaluation results for the method for the determination of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in the blood of laboratory animals (additional validation parameters)

Испытание <i>Test</i>	Концентрация <i>Concentration</i>	TFISA		M1		M2		
		$\delta$ , %	RSD, %	$\delta$ , %	RSD, %	$\delta$ , %	RSD, %	
Межсерийная правильность и прецизионность <i>Between-run accuracy and precision</i>	НПКО (LLOQ)	3,89	8,90	-5,87	9,78	1,66	12,84	
	LQC	4,88	5,75	5,06	10,86	0,54	6,91	
	MQC	2,89	4,37	-6,32	7,13	1,19	6,29	
	HQC	0,64	7,42	-9,09	3,17	2,07	7,04	
Воспроизводимость при повторном вводе серии (72 ч) <i>Reinjection reproducibility (72 h)</i>	НПКО (LLOQ)	1,08	6,42	3,00	6,54	7,77	8,02	
	LQC	4,10	4,12	8,14	12,95	4,80	8,26	
	MQC	9,09	4,40	3,51	2,09	0,03	3,32	
	HQC	1,44	3,56	2,61	4,25	-0,49	3,26	
Эффект разведения образца (двухкратное разведение) <i>Dilution integrity (two-fold dilution)</i>	Dil	7,95	3,06	6,48	3,37	6,87	4,14	
Эффект матрицы <i>Matrix effect</i>	Концентрация <i>Concentration</i>	NMF	RSD (NMF), %	NMF	RSD (NMF), %	NMF	RSD (NMF), %	
	Крыса <i>Rat</i>	LQC	0,875	1,93	0,836	1,83	0,907	3,57
		HQC	0,908	5,14	0,884	4,70	0,887	8,75
	Кролик <i>Rabbit</i>	LQC	0,872	1,91	0,874	4,60	0,922	2,73
		HQC	0,886	3,71	0,863	4,73	0,920	2,64

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** НПКО – нижний предел количественного определения; LQC, MQC, HQC – образцы контроля качества нижнего, среднего и верхнего уровней; Dil – концентрация для оценки эффекта разведения; TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид;  $\delta$  – относительная погрешность, NMF – коэффициент вариации нормализованного фактора матрицы, RSD – относительное стандартное отклонение.

**Note.** LLOQ, lower limit of quantification; LQC, low concentration quality control sample; MQC, middle concentration quality control sample; HQC, high concentration quality control sample; Dil, concentration for the dilution integrity test; TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide;  $\delta$ , relative error; NMF, coefficient of variation of the normalised matrix factor; RSD, relative standard deviation.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биоаналитическая методика количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его N-гидрокси- и N-ацетилпроизводного в крови лабораторных животных была валидирована согласно актуальным регуляторным требованиям. В ходе испытаний были доказаны селективность, линейность калибровочной зависимости, правильность, прецизионность и отсутствие влияния разведения пробы на данные характеристики методики, отсутствие переноса аналитов и внутреннего стандарта из предыдущей пробы, эффекта матрицы, а также воспроизводимость при повторном введении аналитической серии. Использование смеси натрия фторида и калия оксалата в качестве антикоагулянта обеспечило стабильность N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и других аналитов в пробах в процессе их обработки и хранения в морозиль-

ной камере. Широкий аналитический диапазон методики позволил измерить как высокие концентрации аналитов на начальных временных точках (без дополнительного разведения), так и их следовые количества в поздних точках отбора.

В результате исследования фармакокинетики глазной суспензии изучаемого ЛС зафиксированы высокие концентрации действующего вещества и N-гидроксиметаболита в крови крыс, а также длительный период их выведения как при инстилляции в глаз, так и при внутрибрюшинной инъекции. Содержание метаболита (N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида) в крови значительно ниже, чем неизменного действующего вещества и его N-гидроксипроизводного, и его элиминация происходит значительно быстрее. Также установлено, что 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламид при использовании в данной лекарственной форме имеет высокую величину относительной биодоступности.

**Таблица 7.** Испытание стабильности 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в крови крыс

**Table 7.** Stability testing of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in rat blood

Испытание <i>Test</i>	Температурный режим <i>Temperature mode</i>	Отклонение от номинального значения, % <i>Deviation from the nominal value, %</i>					
		TFISA		M1		M2	
		LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
Краткосрочная стабильность <i>Short-term stability</i>	Хладоэлемент со льдом (24 ч) <i>Ice pack (24 h)</i>	5,72	-8,78	-3,92	-9,57	0,22	-4,69
Стабильность после 3 циклов заморозки и разморозки <i>Stability after 3 freeze-thaw cycles</i>	Не выше -70 °C (12 ч) / Хладоэлемент со льдом (4 ч) <i>No higher than -70 °C (12 h) / Ice pack (4 h)</i>	6,76	-0,94	-0,89	-4,57	1,33	-1,84
Стабильность приготовленных проб в автосэмплере <i>Autosampler stability</i>	Не выше +4 °C (48 ч) <i>No higher than +4 °C (48 h)</i>	7,92	1,23	-3,33	-12,84	1,24	2,82
Долгосрочная стабильность <i>Long-term stability</i>	Не выше -70 °C (30 сут) <i>No higher than -70 °C (30 days)</i>	1,91	-4,57	-3,5	-7,76	2,33	-4,57

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** LQC – нижний уровень концентраций; HQC – верхний уровень концентраций; TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид.

**Note.** LQC, low concentration quality control sample; HQC, high concentration quality control sample; TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide.

**Таблица 8.** Фармакокинетические параметры 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его метаболитов в крови крысы

**Table 8.** Pharmacokinetic parameters of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in rat blood

	Параметр <i>Parameter</i>		$C_{\max}$ , нг/мл <i>(ng/mL)</i>	$T_{\max}$ , ч <i>(h)</i>	$AUC_{0-t}$ , нг*ч/мл <i>(ng*h/mL)</i>	$AUC_{0-\infty}$ , нг*ч/мл <i>(ng*h/mL)</i>	$T_{1/2}$ , ч <i>(h)</i>	$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup> <i>(h<sup>-1</sup>)</i>	MRT, ч <i>(h)</i>
TFISA	Инстилляционная в глаз <i>Ocular instillation</i>	M	8173	2,8	394313	440507	58,2	0,0122	68,7
		SD	1491	2,6	85096	114764	10,3	0,0023	6,0
		RSD	18.3	92,5	21.6	26.1	17,7	18.87	8,7
		SEM	609	1,1	34740	46852	4,2	0,0009	2,4
	Внутрибрюшинное введение <i>Intraperitoneal administration</i>	M	11638	1,3	437248	463706	60,9	0,0130	61,1
		SD	3098	0,3	105972	103362	29,5	0,0042	5,1
		RSD	26.6	21,9	24.2	22.3	48,5	32,26	8,4
		SEM	1265	0,1	43263	42197	12,0	0,0017	2,1
M1	Инстилляционная в глаз <i>Ocular instillation</i>	M	695	7,7	18795	20477	70,5	0,0107	47,9
		SD	271	0,8	5575	6185	24,0	0,0031	4,2
		RSD	39.0	10,7	29.7	30.2	34,0	28,93	8,8
		SEM	111	0,3	2276	2525	9,8	0,0013	1,7
	Внутрибрюшинное введение <i>Intraperitoneal administration</i>	M	1624	1,8	18826	20734	93,0	0,0083	35,5
		SD	168	0,6	5139	6755	33,9	0,0031	7,3
		RSD	10.4	33,0	27.3	32.6	36,5	36,89	20,5
		SEM	69	0,3	2098	2758	13,8	0,0013	3,0
M2	Инстилляционная в глаз <i>Ocular instillation</i>	M	6,4	2,4	70,3	73,9	14,5	0,0499	15,4
		SD	1,5	0,9	23,9	24,0	3,3	0,0119	3,4
		RSD	23,74	38,0	34,0	32,5	22,5	23,77	21,9
		SEM	0,6	0,4	9,8	9,8	1,3	0,0048	1,4
M2	Внутрибрюшинное введение <i>Intraperitoneal administration</i>	M	19,0	1,7	141,5	142,7	17,6	0,0546	16,0
		SD	4,7	0,3	64,4	70,3	10,3	0,0336	9,7

Продолжение таблицы 8

Table 8 (continued)

	Параметр Parameter		$C_{max}$ , нг/мл (ng/mL)	$T_{max}$ , ч (h)	$AUC_{0-t}$ , нг*ч/мл (ng*h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ , нг*ч/мл (ng*h/mL)	$T_{1/2}$ , ч (h)	$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup> (h <sup>-1</sup> )	MRT, ч (h)
M2	Внутрибрюшинное введение Intraperitoneal administration	RSD	24,59	15,5	45,6	49,3	58,6	61,48	60,3
		SEM	1,9	0,1	26,3	28,7	4,2	0,0137	4,0

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение; SEM – стандартная ошибка среднего.

$C_{max}$  – максимальная концентрация аналита в крови,  $T_{max}$  – время наступления максимальной концентрации аналита в крови,  $AUC_{0-t}$  – площадь под фармакокинетической кривой начиная с момента приема препарата до времени отбора последнего отбора крови,  $AUC_{0-\infty}$  – площадь под фармакокинетической кривой начиная с момента приема препарата до бесконечности,  $K_{el}$  – константа элиминации,  $T_{1/2}$  – период полувыведения аналита, MRT – среднее время удержания аналита в крови крысы.

**Note.** TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M, mean; SD, standard deviation; RSD, relative standard deviation; SEM, standard error of the mean.

$C_{max}$ , maximum analyte concentration in blood,  $T_{max}$ , time to maximum analyte concentration in blood;  $AUC_{0-t}$ , area under the pharmacokinetic curve from the time of administration to the last blood sampling;  $AUC_{0-\infty}$ , area under the pharmacokinetic curve from the time of administration to infinity;  $K_{el}$ , elimination rate constant;  $T_{1/2}$ , half-life period of the analyte; MRT, mean residence time of the analyte in rat blood.

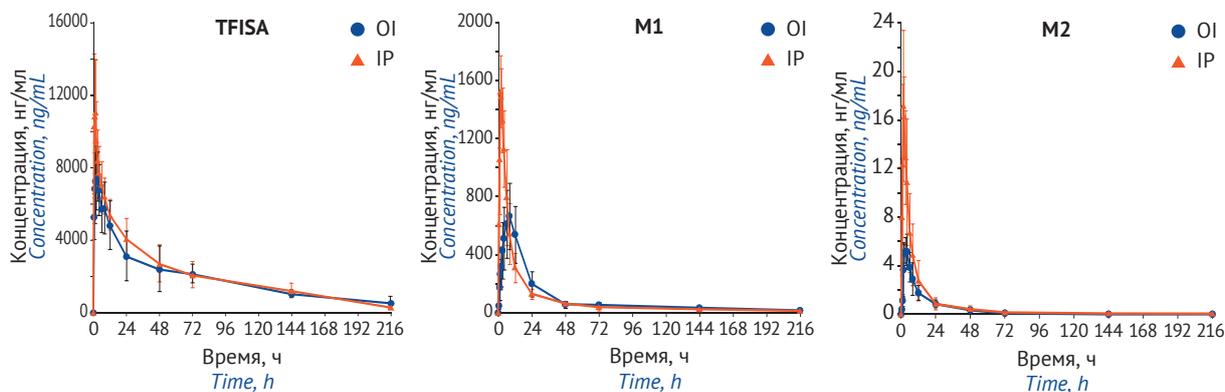


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

**Рис. 3.** Фармакокинетические кривые 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его метаболитов в крови крысы ( $M \pm SD$ ). Красный интервал SD-IP, черный интервал SD-OI

TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; OI – инстилляция в глаз; IP – внутрибрюшинное введение; M – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение.

**Fig. 3.** Pharmacokinetic curves for 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfanilamide and its metabolites in rat blood ( $M \pm SD$ ). The red SD interval is for the intraperitoneal injection (IP), and the black SD interval is for the ocular instillation (OI)

TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M, mean; SD, standard deviation.

Показано, что валидированная методика применима для анализа целевых аналитов в крови как крыс, так и кроликов (установлено сходство ряда валидационных параметров (селективность, эффект матрицы, коэффициенты уравнений регрессии). В дальнейшем

с ее применением планируется осуществить изучение фармакокинетики 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида на кроликах для проверки влияния межвидовых различий в строении глаза на биодоступность данного ЛС.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Popovic MM, Schlenker MB, Thiruchelvam D, Redelmeier DA. Serious adverse events of oral and topical carbonic anhydrase inhibitors. *JAMA Ophthalmol.* 2022;140(3):235–42. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2021.5977>
- Курышева НИ. Ингибиторы карбоангидразы в лечении глаукомы. Обзор. Часть 2. *Офтальмология.* 2020;17(4):676–82. Kuryshva NI. Carbonic anhydrase inhibitors in the treatment of glaucoma. Review. Part II. *Ophthalmology in Russia.* 2020;17(4):676–82 (In Russ.). <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2020-4-676-682>
- Хохлов АЛ, Шетнев АА, Корсаков МК, Федоров ВН, Тюшина АН, Вольхин НН, Вдовиченко ВП. Фармакологические свойства производных сульфонамидов – новых ингибиторов карбоангидразы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2023;175(2):166–70.

- Khokhlov AL, Shetnev AA, Korsakov MK, Fedorov VN, Tyushina AN, Volkhin NN, Vdovichenko VP. Pharmacological properties of sulfonamide derivatives – new inhibitors of carbonic anhydrase. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2023;175(2):166–70 (In Russ.). <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-175-2-166-170>
- Madrewar AB, Deshpande AS, Bhattacharya S. Mini-review on bioanalytical estimation of brinzolamide. *Curr Pharm Anal*. 2022;18(3):265–72. <https://doi.org/10.2174/1573412917666210812103414>
  - Lo Faro AF, Tini A, Gottardi M, Pirani F, Sirignano A, Giorgetti R, et al. Development and validation of a fast ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determining carbonic anhydrase inhibitors and their metabolites in urine and hair. *Drug Test Anal*. 2021;13(8):1552–60. <https://doi.org/10.1002/dta.3055>
  - Khokhlov AL, Yaichkov II, Korsakov MK, Shetnev AA, Volkhin NN, Petukhov SS. Development of quantification methods of a new selective carbonic anhydrase II inhibitor in plasma and blood and study of the pharmacokinetics of its ophthalmic suspension in rats. *Res Results Pharmacol*. 2023;9(4):53–64. <https://doi.org/10.18413/rrpharmacology.9.10056>
  - Yuan Y-S, Liao J-M, Kang C-M, Li B-L, Lei X-R, Yu K-W, et al. A simple and accurate LC-MS/MS method for monitoring cyclosporin A that is suitable for high throughput analysis. *Exp Ther Med*. 2023;26(1):342. <https://doi.org/10.3892/etm.2023.12041>
  - Yu K-W, Li B-L, Yuan Y-S, Liao J-M, Li W-K, Dong H, Ke P-F, et al. A modified LC-MS/MS method for the detection of whole blood tacrolimus and its clinical value in Chinese kidney transplant patients. *Heliyon*. 2022;8(8):e10214. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10214>
  - Verheijen RB, Thijssen B, Atrafi F, Schellens JHM, Rosing H, de Vries N, et al. Validation and clinical application of an LC-MS/MS method for the quantification of everolimus using volumetric absorptive microsampling. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2019;1104:234–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.11.030>
  - Rajput AP, Edlabadkar AP. A coherent analytical review of indapamide. *J Pharm Tech Res Manag*. 2022;10(1):21–35. <https://doi.org/10.15415/jptrm.2022.101004>
  - Gopinath R, Narendran ST, Kumar M. A sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for quantitative bioanalysis of fingolimod in human blood: application to pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr*. 2022;34(6):e4822. <https://doi.org/10.1002/bmc.4822>
  - Raghuvanshi DS, Verma N. An iodine-mediated new avenue to sulfonylation employing N-hydroxy aryl sulfonamide as a sulfonylating agent. *Org Biomol Chem*. 2021;19:4760–7. <https://doi.org/10.1039/d1ob00036e>
  - Аладышева ЖИ, Беляев ВВ, Береговых ВВ, Брких ГЭ, Грейбо СВ, Демина НБ и др. *Промышленная фармацевция. Путь создания продукта*. М.: Российская академия наук; 2019. Aladysheva ZhI, Belyaev VV, Beregovykh VV, Brkich GE, Greibo SV, Demina NB, et al. *Industrial pharmacy: the way to create a product*. Moscow: Russian Academy of Sciences; 2019 (In Russ.). EDN: KWJUK
  - Гайдай ЕА, Гайдай ДС. Генетическое разнообразие экспериментальных мышей и крыс: история возникновения, способы получения и контроля. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2019;(4). Gajdaj EA, Gajdaj DS. Genetic variety of laboratory mice and rats: history of occurrence, methods of obtaining and control. *Laboratory Animals for Science*. 2019;(4) (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-04-09>

**Соответствие принципам этики.** Проведение исследования одобрено этическим комитетом ЯГПУ им. К.Д. Ушинского (протокол № 2 от 10.10.2023).

**Дополнительная информация.** На сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» размещены: таблица 6, рисунок 1, рисунок 2. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-table6> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-fig1> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-fig2>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: И.И. Яичков – разработка и валидация биоаналитической методики, анализ образцов биоматериала животных, написание текста рукописи; А.Л. Хохлов – критическое обсуждение и окончательное утверждение текста рукописи; М.К. Корсаков, А.А. Шетнев – критическое обсуждение и редактирование текста рукописи; Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов – выполнение работ с лабораторными животными.

**Ethics approval.** The study was approved by the Ethics Committee at the Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky (Approval No. 2 of 10.10.2023).

**Additional information.** The following additional materials are posted on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*: Table 6, Figure 1, and Figure 2. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-table6> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-fig1> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316-fig2>

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Ilya I. Yaichkov developed and validated the bioanalytical procedure, analysed samples of animal biological material, and drafted the manuscript. Alexander L. Khokhlov participated in the critical discussion of the manuscript and approved the final version for publication. Mikhail K. Korsakov and Anton A. Shetnev participated in the critical discussion and editing of the manuscript. Nikita N. Volkhin and Sergey S. Petukhov handled laboratory animals.

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Яичков Илья Игоревич**, канд. фарм. наук / Ilya I. Yaichkov, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0066-7388>

**Хохлов Александр Леонидович**, академик РАН, д-р мед. наук, профессор / Alexander L. Khokhlov, Academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>

**Корсаков Михаил Константинович**, д-р хим. наук, доцент / Mikhail K. Korsakov, Dr. Sci. (Chem.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0913-2571>

**Шетнев Антон Андреевич**, канд. хим. наук / Anton A. Shetnev, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4389-461X>

**Вольхин Никита Николаевич** / Nikita N. Volkhin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4275-9037>

**Петухов Сергей Станиславович** / Sergey S. Petukhov

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8435-7689>

Поступила 01.04.2024

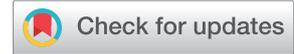
После доработки 23.04.2024

Принята к публикации 18.06.2024

Received 1 April 2024

Revised 23 April 2024

Accepted 18 June 2024



Ю.А. Никонова ✉   
С.Г. Аббасова   
П.Е. Каргополова   
О.М. Стрижакова   
И.В. Лягоскин   
А.П. Васильев   
А.С. Першин 

## Валидация методики оценки биологической активности лекарственного препарата на основе тоцилизумаба и определение критериев приемлемости результатов анализа

Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ»,  
Владимирская ул., д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский р-н,  
Владимирская обл., 601125, Российская Федерация

✉ Никонова Юлия Александровна; [yanikonova@ibcgenerium.ru](mailto:yanikonova@ibcgenerium.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Для биоаналитических методик характерны большая вариабельность и меньшая устойчивость по сравнению с физико-химическими методиками в силу лабильности характеристик живых тест-систем. Поскольку в нормативных документах не определен единый подход к формированию перечня критериев пригодности системы и допустимых границ для полученных результатов, то их устанавливают на основании валидационных испытаний.

**ЦЕЛЬ.** Получить экспериментальное подтверждение соответствия методики оценки биологической активности лекарственного средства на основе разрабатываемого биоаналога тоцилизумаба (GNR-087) валидационным требованиям и определить количественные границы критериев пригодности аналитической системы и приемлемости результатов анализа.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Биологическую активность биоаналога тоцилизумаба оценивали по ингибированию интерлейкин-6-зависимой секреции эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP), продуцируемой клетками репортерной линии НЕК-Blue™ IL-6. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения Prism 6.0.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Специфичность методики подтверждена дозозависимым ингибированием интерлейкин-6-зависимой секреции эмбриональной щелочной фосфатазы клетками при действии тоцилизумаба. Методика линейна, коэффициент детерминации линейной функции  $R^2 \geq 0,99$ . Прецизионность методики удовлетворительная, сходимость – от 2 до 9%, внутрилабораторная прецизионность – 9 и 14%. Коэффициенты выявления активности ( $R_c$ ) модельных образцов с симулированной активностью от 60 до 140%, в том числе и «слепых проб», находились в диапазоне 80–120%. Теоретические значения относительной специфической активности ( $RP$ ) находились внутри доверительных интервалов средних найденных значений  $RP$ , что подтвердило правильность методики. Подтверждена устойчивость методики к контролируемым изменениям: использованию репортерных клеток разных пассажей (коэффициент вариации ( $CV_{RP}$ ) составил 10%), замене лотов ИЛ-6 ( $CV_{RP}=1\%$ ) и реагента для детекции SEAP ( $CV_{RP}=3\%$ ), при этом значение  $R_c$  находилось в диапазоне 80–120% от номинального значения  $RP$ .

**ВЫВОДЫ.** Методика оценки биологической активности биоаналога тоцилизумаба соответствует валидационным характеристикам, таким как правильность, линейность, прецизионность, специфичность и устойчивость к контролируемым изменениям. Установлены границы критериев пригодности системы и рассчитаны критерии приемлемости результатов биологического анализа. Разработанная методика может служить как для рутинного контроля биологической активности, так и для использования в исследованиях при доказательстве биоподобия разрабатываемых препаратов оригинальному (референтному) препарату, содержащему тоцилизумаб.

**Ключевые слова:** биологический анализ; специфическая активность; валидация аналитических методик; критерии приемлемости результатов анализа; критерии пригодности системы; тоцилизумаб; биологическая активность; интерлейкин-6

**Для цитирования:** Никонова Ю.А., Аббасова С.Г., Каргополова П.Е., Стрижакова О.М., Лягоскин И.В., Васильев А.П., Першин А.С. Валидация методики оценки биологической активности лекарственного препарата на основе тоцилизумаба и определение критериев приемлемости результатов анализа. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):317–329. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329>

**Финансирование.** Работа выполнена при спонсорской поддержке АО «ГЕНЕРИУМ».

**Потенциальный конфликт интересов.** Все авторы являются сотрудниками компании АО «ГЕНЕРИУМ». Существует потенциальный конфликт интересов в связи с финансированием данной научной работы АО «ГЕНЕРИУМ» и заинтересованностью последнего в результатах работы. Однако при написании рукописи авторы руководствовались соображениями научной ценности полученного материала и заявляют о беспристрастности оценки полученных данных.

Yulia A. Nikonova    
Svetlana G. Abbasova   
Polina E. Kargopolova   
Olga M. Strizhakova   
Ivan V. Lyagoskin   
Alexandr P. Vasilev   
Andrey S. Pershin 

## Validation of an Analytical Procedure for Evaluating the Biological Activity of a Medicinal Product Based on Tocilizumab and Determination of Acceptance Criteria for Test Results

GENERIUM JSC,  
14 Vladimirskaaya St., Volginsky, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125,  
Russian Federation

✉ Yulia A. Nikonova; [yanikonova@ibcgenerium.ru](mailto:yanikonova@ibcgenerium.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Bioanalytical techniques are characterised by greater variability and lower stability than physicochemical methods because live test systems are inherently labile. Since regulatory standards do not establish a unified approach, the selection of system suitability criteria and acceptance criteria for test results is based on validation studies.

**AIM.** This study aimed to validate an analytical procedure for evaluating the biological activity of a medicinal product based on the investigational tocilizumab biosimilar GNR-087 and determine the quantitative limits for system suitability criteria and acceptance criteria for test results.

**MATERIALS AND METHODS.** The biological activity of the investigational tocilizumab biosimilar was assessed by the inhibition of IL-6-induced secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) expression by HEK-Blue™ IL-6 cells. Statistical processing of the obtained results was performed using Prism 6.0 software.

**RESULTS.** The specificity of the analytical procedure was confirmed by the dose-dependent inhibition of IL-6-induced SEAP expression by cells observed with tocilizumab. The analytical procedure was linear, with a coefficient of determination  $R^2 \geq 0.99$ . The precision of the analytical procedure was satisfactory; its repeatability varied from 2 to 9%, and its intermediate precision was 14%. The recovery coefficients ( $R_c$ ) for spiked samples simulating activity levels of 60–140%, including blinded samples, ranged from 80 to 120%. The theoretical values of relative potency ( $RP$ ) were within the confidence intervals of the mean relative potency estimates, which confirmed the accuracy of the analytical procedure. The validation confirmed the robustness of the analytical procedure to controlled variations, including the use of reporter cells at different passages (with a coefficient of variation for relative potency estimates ( $CV_{RP}$ ) of 10%), different IL-6 lots (with a  $CV_{RP}$  of 1%), and different SEAP detection reagent lots (with a  $CV_{RP}$  of 3%); the  $R_c$  remained in the range of 80–120% of the nominal  $RP$  value.

**CONCLUSIONS.** The analytical procedure for evaluating the biological activity of the investigational tocilizumab biosimilar meets the validation criteria, including accuracy, linearity, precision, specificity, and robustness. The study established

system suitability criteria and acceptable limits for biological assay results. This analytical procedure can be used both for routine biological activity control and for demonstrating the biosimilarity of new medicinal products to the original (reference) tocilizumab-based medicinal product.

**Keywords:** biological assay; potency; validation of analytical procedures; acceptance criteria for test results; system suitability criteria; tocilizumab; biological activity; interleukin-6

**For citation:** Nikonova Yu.A., Abbasova S.G., Kargopolova P.E., Strizhakova O.M., Lyagoskin I.V., Vasilev A.P., Pershin A.S. Validation of an analytical procedure for evaluating the biological activity of a medicinal product based on tocilizumab and determination of acceptance criteria for test results. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):317–329. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329>

**Funding.** The study reported in this paper was carried out with the financial support of GENERIUM JSC.

**Disclosure.** All the authors are employed by Generium JSC. There is a potential conflict of interest due to the financial support by GENERIUM JSC and the interest it takes in the study results. However, when writing this paper, the authors were guided by considerations of the scientific value of the material obtained and declare impartiality in their data assessment.

## ВВЕДЕНИЕ

Интерлейкин-6 (ИЛ-6) относится к цитокинам острой воспалительной фазы и участвует в регуляции функций иммунной, кроветворной, нервной и других систем организма. Показано значимое влияние ИЛ-6 на развитие ревматоидного артрита, пролиферацию опухолевых клеток при раке кишечника, поджелудочной железы, молочной железы, множественной миеломе и других онкологических заболеваниях [1]. Также описана стимулирующая роль ИЛ-6 в развитии «цитокинового шторма» при заболевании COVID-19 [2, 3]. Одним из способов терапии этих состояний является использование лекарственных средств (ЛС) на основе моноклональных антител (мАт), направленных на инактивацию ИЛ-6, в частности тоцилизумаба. Тоцилизумаб – это рекомбинантное гуманизированное мАт подкласса иммуноглобулинов IgG1, взаимодействующее с экстраклеточной частью мембраноассоциированных и растворимых форм рецептора ИЛ-6. Связывание тоцилизумаба блокирует взаимодействие рецептора с ИЛ-6 и таким образом ингибирует биологическое действие ИЛ-6 [4].

Критическим показателем качества любого биотехнологического ЛС, будь то гормоны, цитокины или моноклональные антитела, является специфическая биологическая активность<sup>1</sup>. Биологические методики оценки специфической активности в условиях *in vitro* уникальны для каждого ЛС, поскольку результат анализа должен коррелировать с терапевтической эффективностью препарата [5].

Для оценки способности тоцилизумаба связываться со своей мишенью применяют такие методы, как иммуоферментный анализ (ИФА), поверхностный плазмонный резонанс или проточная цитометрия. Однако данные подходы отражают только первый этап механизма действия тоцилизумаба. Комплексно оценить активность ЛС можно с применением методик, основанных на использовании клеточных культур, которые отвечают на сигнал, запускаемый связыванием ИЛ-6 со своим рецептором, что позволяет количественно оценить функциональные свойства препарата. Так, например, можно использовать методы ИФА или проточной цитометрии, основанные на оценке ИЛ-6-индуцированного фосфорилирования сигнального транскрипционного белка STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), запускаемого связыванием ИЛ-6 со своим рецептором [6]. Недостатком таких подходов является их многоэтапность, что отрицательно влияет на прецизионность методик. Специфическую активность тоцилизумаба [6] предложено оценивать по антипролиферативному эффекту ЛС на ИЛ-6-зависимые клетки линии В-клеточной лимфомы DS-1 (ATCC® CRL-11102™). Однако нами был выбран подход с использованием репортерной линии клеток HEK-Blue™ IL-6. Связывание ИЛ-6 со своим рецептором на поверхности указанных клеток активирует янус-киназу и фосфорилирование STAT3, что запускает синтез секретлируемой щелочной фосфатазы (secreted embryonic alkaline phosphatase, SEAP). Данная методика обладает рядом преимуществ:

<sup>1</sup> ICH Q6B Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. CPMP/ICH/365/96. EMA; 1999.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза», глава 10 «Разработка, производство, установление характеристик и спецификации моноклональных антител и их производных».

- 1) демонстрирует специфичный дозозависимый ответ клеток на ИЛ-6;
- 2) отражает воспроизведение механизма передачи внутриклеточного сигнала после связывания ИЛ-6 с рецептором через фосфорилирование STAT3;
- 3) отличается относительной простотой выполнения.

Цель работы – получить экспериментальное подтверждение соответствия методики оценки биологической активности лекарственного средства на основе разрабатываемого биоаналогоа тоцилизумаба (GNR-087) валидационным требованиям и определить количественные границы критериев пригодности аналитической системы и приемлемости результатов анализа.

Для достижения поставленной цели необходимо было оценить специфичность, правильность, линейность в аналитическом диапазоне, прецизионность и устойчивость методики к внесению контролируемых изменений, установить количественные границы критериев пригодности аналитической системы и критериев приемлемости результатов анализа, что является неотъемлемой частью валидации методики и гарантией достоверности полученных с помощью этой методики результатов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Как правило, при количественной оценке биологической активности анализируют не менее 6–8 серийных разведений стандартного (СО) и испытуемого образца (ИО), каждое разведение тестируют в 3–4 повторностях и аппроксимируют зависимость «доза – ответ» для каждого образца 4-параметрической функцией (4PL). В таких случаях специфическая активность определяется как отношение найденных значений полумаксимальных разведений или концентраций СО и ИО. В качестве критериев пригодности аналитической системы обычно устанавливают параметры для положительного и отрицательного контролей, а также для СО. Критерии приемлемости результатов анализа включают критерии для ИО. При обработке первичных данных необходимо использовать двухуровневую последовательную оценку их соответствия выбранным критериям. На первом этапе необходимо оценить соответствие первичных данных анализа критериям пригодности системы. Несовпадение данных на этом этапе означает, что полученные результаты следует признать недостоверными и повторить анализ.

Соблюдение критериев пригодности системы позволяет перейти ко второму этапу – оценке соответствия данных анализа критериям приемлемости для ИО. Расчет специфической активности ИО производят только в том случае, если первичные данные удовлетворяют критериям приемлемости результатов анализа<sup>2</sup>.

При разработке методики в качестве критериев пригодности аналитической системы использовали следующие параметры:

- 1) разность средних значений оптической плотности (ОП) отрицательного (клетки в базовой среде) и положительного (клетки в среде для теста, содержащей ИЛ-6) контрольных образцов;
- 2) соотношение средних значений ОП максимального и минимального разведений образцов со средними значениями ОП отрицательного и положительного контрольных образцов соответственно;
- 3) коэффициент вариации ОП ( $CV_{OP}$ , %) для каждого разведения СО и контрольных образцов;
- 4) коэффициент детерминации ( $R^2$ ) кривой зависимости ОП от логарифма разведений СО. Критерии оценки параллелизма включали:
- 5) соотношение углов наклона (slope);
- 6) соотношения верхних (top) и нижних (bottom) асимптот кривых зависимости «доза – ответ» СО и ИО [7, 8].

Критериями приемлемости для ИО являлись значения  $CV_{OP}$  для каждого разведения и  $R^2$  кривой зависимости «доза – ответ».

### Приготовление модельных образцов GNR-087.

Модельные образцы (МО) с различным содержанием GNR-087 готовили в среде для выполнения теста ДМЕМ/Ф12 (ООО НПП «ПанЭко», кат. № С470п), содержащей фетальную бычью сыворотку 10% об. (Capricorn Scientific GmbH, кат. № FBS-HI-11A), L-глутамин 2 мМ (ООО НПП «ПанЭко», кат. № Ф032), смесь пенициллина 100 ЕД/мл и стрептомицина 0,1 мг/мл (ООО НПП «ПанЭко», кат. № А075) и ИЛ-6 1 нг/мл (R&D Systems, кат. № 206-IL-010) согласно *таблице 1*. Каждый МО анализировали в 12 последовательных разведениях с шагом 1:3. Для МО с активностью 100% диапазон разведения по концентрации белка составил 1987,3–0,0112 нМ (кратность от 68 до 12045996).

Продолжительность полного аналитического цикла составляла 3 сут. На один планшет для анализа вносили разведения одного из МО с симулированной активностью от 60 до 140% (МО-ИО) и разведения МО с активностью 100%,

<sup>2</sup> ICH Q2(R1) Validation of analytical test procedures: text and methodology. CPMP/ICH/381/95. EMA; 1995.

ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

**Таблица 1.** Приготовление модельных образцов с симулированной активностью (разведение № 1 для анализа)

**Table 1.** Preparation of spiked samples with simulated biological activity (Test Dilution 1)

Модельный образец (МО) <i>Spiked sample (SS)</i>	Активность МО, % <i>SS activity, %</i>	Объем внесенного GNR-087, мкл <i>GNR-087 spike volume, <math>\mu</math>L</i>	Объем среды для теста, мкл <i>Matrix volume, <math>\mu</math>L</i>
МО-ИО_60 <i>SS-TS_60</i>	60	6	674
МО-ИО_80 <i>SS-TS_80</i>	80	8	672
МО-СО/ИО_100 <i>SS-RS/TS_100</i>	100	10	670
МО-ИО_120 <i>SS-TS_120</i>	120	12	658
МО-ИО_140 <i>SS-TS_140</i>	140	14	656

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

**Примечание.** МО – модельный образец, СО – стандартный образец, ИО – испытуемый образец.

**Note.** SS, spiked sample; RS, reference standard; TS, test sample.

который использовали в качестве стандартного образца (МО-СО), а также положительные и отрицательные контрольные образцы. Каждый аналитический цикл состоял из трех этапов: 1) расев репортерных клеток на планшет, инкубация клеток; 2) внесение на планшет МО-СО, МО-ИО и контрольных образцов; 3) спектрофотометрическая оценка количества SEAP. В зависимости от вида валидационного испытания в течение одного аналитического цикла оценку количества SEAP проводили для одного или нескольких планшетов с независимо приготовленными разведениями МО-СО и МО-ИО.

**Процедура анализа.** Культивирование клеток HEK-Blue™ IL-6 (InvivoGen, кат. № hkb-hil6) проводили в базовой среде согласно инструкции производителя: ДМЕМ/Ф12, содержащая фетальную бычью сыворотку (10%), L-глутамин (2 мМ), пенициллин (100 ЕД/мл), стрептомицин (0,1 мг/мл) с добавлением Нормоцина™ (100 мкг/мл) (InvivoGen, кат. № ant-nr-05) и Селектиона™ (0,004% об.) (InvivoGen, кат. № hb-sel). Во всех валидационных испытаниях кроме тестирования методики по критерию «устойчивость к смене пассажа клеток» использовали клетки 6-го пассажа. В лунки плоскодонных 96-луночных планшетов вносили 100 мкл клеточной суспензии с концентрацией 200 тыс. кл./мл в базовой среде и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе Galaxy 170S (Eppendorf) при температуре 37±1 °С, 5,0±0,5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности (стандартные условия) в течение 20±2 ч. После инкубации в лунки вносили по 100 мкл одного из МО-ИО и разведения МО-СО. В лунки отрицательного контроля (К-) вносили по 100 мкл базовой среды, в лунки положительного контроля (К+) вносили по 100 мкл

среды для выполнения теста. МО-ИО и МО-СО тестировали в трех повторностях для каждого разведения, а отрицательный и положительный контрольные образцы – в шести повторностях. Инкубировали клетки с образцами в течение 24±1 ч в стандартных условиях, после чего вносили по 100 мкл реагента для детекции SEAP (InvivoGen, кат. № гер-qbs). Инкубировали в стандартных условиях в течение 60±5 мин и измеряли ОП на планшетном спектрофотометре Infinite M200 (Tecan Group Ltd) при длине волны 655 нм.

#### **Статистическая обработка результатов.**

Обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 6.0, аппроксимируя зависимость значений ОП от десятичного логарифма величины, обратной разведению образца ( $\lg 1/\text{dilution}$ ), функцией ингибирования 4PL. Значения полумаксимального ингибирующего разведения ( $ID_{50}$ ) и  $R^2$  для СО и ИО рассчитывали автоматически. Расчет средних значений ОП, стандартного отклонения ( $SD$ ), значений  $CV_{оп}$  и критериев пригодности системы проводили с использованием программы Microsoft Excel.

Полученные результаты сначала оценивали на соответствие критериям пригодности системы, а затем – критериям приемлемости результатов анализа для ИО.

Критерии пригодности системы:

- коэффициент детерминации  $R^2$  дозозависимой кривой СО должен быть не менее 0,95;
- коэффициент вариации  $CV_{оп}$  для каждого разведения СО, а также для положительного и отрицательного контрольных образцов не должен превышать 20%.

Критерии приемлемости результатов анализа для ИО:

- соотношение значений верхних асимптот дозозависимых кривых СО и ИО должно быть в пределах 0,8–1,25;
- соотношение значений нижних асимптот дозозависимых кривых СО и ИО должно быть в пределах 0,8–1,25;
- соотношение значений углов наклона дозозависимых кривых СО и ИО должно быть в пределах 0,8–1,25;
- коэффициент детерминации  $R^2$  дозозависимой кривой ИО должен быть не менее 0,95;
- коэффициент вариации  $CV_{оп}$  для каждого разведения ИО не должен превышать 20%.

При соблюдении критериев приемлемости для ИО рассчитывали значения относительной специфической активности ( $RP$ , %), используя формулу:

$$RP = \frac{ID_{50}(MO-CO_{100})}{ID_{50}(MO-IO_X)} \times 100\%, \quad (1)$$

где  $ID_{50}(MO-CO_{100})$  – значение  $ID_{50}$  для МО со 100% активностью (СО);  
 $ID_{50}(MO-IO_X)$  – значение  $ID_{50}$  для МО с симулированной активностью (ИО).

Правильность определения значения  $RP$  для тестируемой пробы – коэффициент выявления (recovery) – ( $Rc$ , %) вычисляли по формуле:

$$Rc = \frac{RP_{найд}}{RP_{теор}} \times 100\%, \quad (2)$$

где  $RP_{найд}$  и  $RP_{теор}$  – найденное и теоретическое значения относительной специфической активности препарата соответственно.

Оценивали следующие валидационные характеристики методики: специфичность, прецизионность, правильность, линейность и робастность (устойчивость).

#### **Выполнение валидационных испытаний.**

Специфичность методики определяли в одном аналитическом цикле, используя в качестве МО-ИО мАТ с другой специфичностью, но сходным строением Fc-фрагмента. Валидационные испытания по оценке прецизионности методики (повторяемости/сходимости и внутрилабораторной прецизионности между аналитиками и между днями) проводили в течение нескольких независимых аналитических циклов.

Сходимость оценивали по величине коэффициента вариаций значений  $RP$  ( $CV_{RP}$ , %), полученных

в трех независимых АЦ, проведенных каждым из аналитиков в течение короткого промежутка времени. Внутрилабораторную прецизионность между аналитиками оценивали по величине  $CV_{RP}$ , рассчитанной как среднее значение результатов, полученных двумя аналитиками в АЦ, проведенных одновременно. Внутрилабораторную прецизионность между днями также оценивали по величине  $CV_{RP}$  каждого МО-ИО с симулированной активностью от 60 до 140%, полученной в разных аналитических циклах каждым аналитиком.

Правильность методики оценивали на МО с симулированной активностью в диапазоне от 60 до 140% номинальной активности (не менее пяти МО-ИО). Методику считали соответствующей критерию «правильность», если значения, принимаемые за истинные ( $RP_{теор}$ ), лежали внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов, полученных экспериментально ( $RP_{найд}$ )<sup>3</sup>. Дополнительно для оценки правильности методики каждым аналитиком был проведен аналитический цикл с образцом с неизвестной симулированной активностью («слепая проба»).

Линейность методики в аналитическом диапазоне (60–140% активности) проверяли с использованием пяти МО-ИО с симулированной активностью. Для оценки линейности строили график линейной регрессии  $RP_{найд}$  от  $RP_{теор}$  и график остатков.

Оценку устойчивости методики проверяли, внося в аналитическую систему контролируемые изменения: 1) использование клеток разных пассажей (от 6 до 10); 2) использование ИЛ-6 двух разных лотов; 3) использование реагента для детекции SEAP двух разных лотов.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

На этапе разработки методики были подобраны оптимальные условия проведения анализа – концентрация ИЛ-6 и диапазон разведений GNR-087, количество клеток на лунку, время инкубации и др. В качестве основных критериев рассматривали характеристики дозозависимой кривой 4PL, соответствующие следующим требованиям:

- диапазон разведений тоцилизумаба должен давать размах значений ОП от уровня значений ОП положительного контрольного образца (К+, среда для выполнения теста) до уровня значений ОП отрицательного контрольного образца (К–, базовая среда),

<sup>3</sup> ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

при этом значения ОП при минимальном и максимальном разведении ЛС должны быть близки к значениям К<sup>-</sup> и К<sup>+</sup> соответственно;

- дозозависимая кривая должна быть симметричной, при этом на верхней и нижней асимптотах должно быть не менее 3-х точек и не менее 3-х точек должно находиться на линейной части кривой [5].

Типичная дозозависимая кривая представлена на *рисунке 1*.

При определении специфичности методики использовали омализумаб (серия AVXS257506, «Новартис Фарма АГ»), поскольку омализумаб, как и тоцилизумаб, относится к подклассу IgG1 антител, но имеет другую специфичность и не способен связывать рецептор ИЛ-6. Омализумаб вносили в аналитическую систему в концентрациях, соответствующих концентрациям тоцилизумаба в разведениях МО-ИО\_100, при этом разведения тоцилизумаба использовали как СО, а разведения омализумаба как ИО. Результаты считали приемлемыми, если критерии пригодности системы были соблюдены и наблюдалось дозозависимое ингибирование тоцилизумабом ИЛ-6-зависимой секреции SEAP, а при действии омализумаба ингибирование отсутствовало. Полученные результаты подтвердили специфичность методики (*рис. 2*).

Прецизионность методики определяют по близости результатов, получаемых одним аналитиком в нескольких аналитических циклах, проведенных в течение короткого промежутка

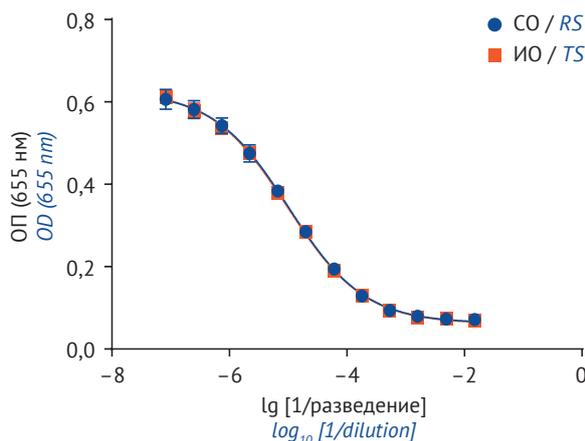


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

**Рис. 1.** Зависимость оптической плотности (ОП) от логарифма разведений тоцилизумаба в стандартном (СО) и испытуемом (ИО) образцах

**Fig. 1.** Optical density (OD) as a function of log dilution of tocilizumab for the reference standard (RS) and the test sample (TS)

времени (сходимость, повторяемость) и (или) разными аналитиками в разные дни (промежуточная, внутрилабораторная прецизионность)<sup>4</sup>. Методику считали соответствующей критериям прецизионности, если  $CV_{RP}$  для каждого МО-ИО не превышал 20%.

Тестирование методики по показателям «сходимость» и «внутрилабораторная прецизионность между аналитиками» проводили два аналитика с использованием МО-ИО\_100. Разброс значений  $RP$ , полученный в испытаниях «сходимость» и «внутрилабораторная прецизионность между аналитиками», представлен на *рисунке 3*.

В испытании сходимости средние значения  $RP \pm SD$  составили  $102 \pm 9\%$  и  $107 \pm 4\%$  у аналитиков 1 и 2.  $CV_{RP}$  между аналитическими циклами аналитиков 1 и 2 был 8 и 4% соответственно. При тестировании «воспроизводимости между аналитиками»  $RP \pm SD$  были равны  $105 \pm 0,7\%$ ,  $111 \pm 1,4\%$  и  $99 \pm 8,5\%$  в аналитических циклах 1–3. Значения  $CV_{RP}$  составили 1% в аналитических циклах 1–2 и 9% в аналитическом цикле 3.

Для оценки внутрилабораторной прецизионности между днями каждым аналитиком было протестировано по пять ИО-МО с симулированной активностью от 60 до 140%. Было выполнено по три независимых аналитических цикла с каждым МО-ИО с разницей в несколько дней. Разброс значений  $RP_{\text{найд}}$

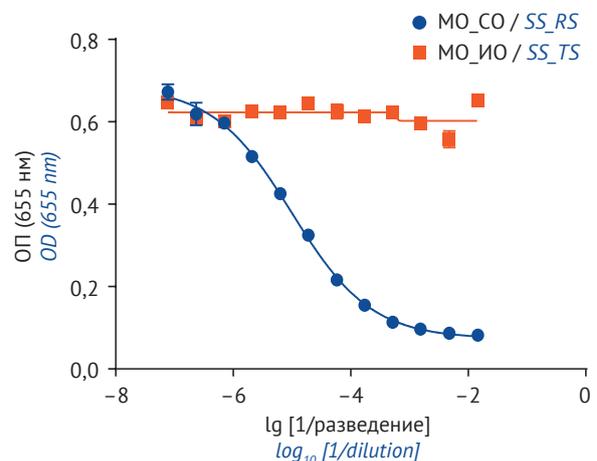


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

**Рис. 2.** Зависимость оптической плотности (ОП) от логарифма разведений тоцилизумаба (стандартный образец, МО\_СО) и омализумаба (испытуемый образец, МО\_ИО) при определении специфичности методики

**Fig. 2.** Optical density (OD) as a function of log dilution of tocilizumab (reference standard, SS\_RS) and omalizumab (test sample, SS\_TS)

<sup>4</sup> ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

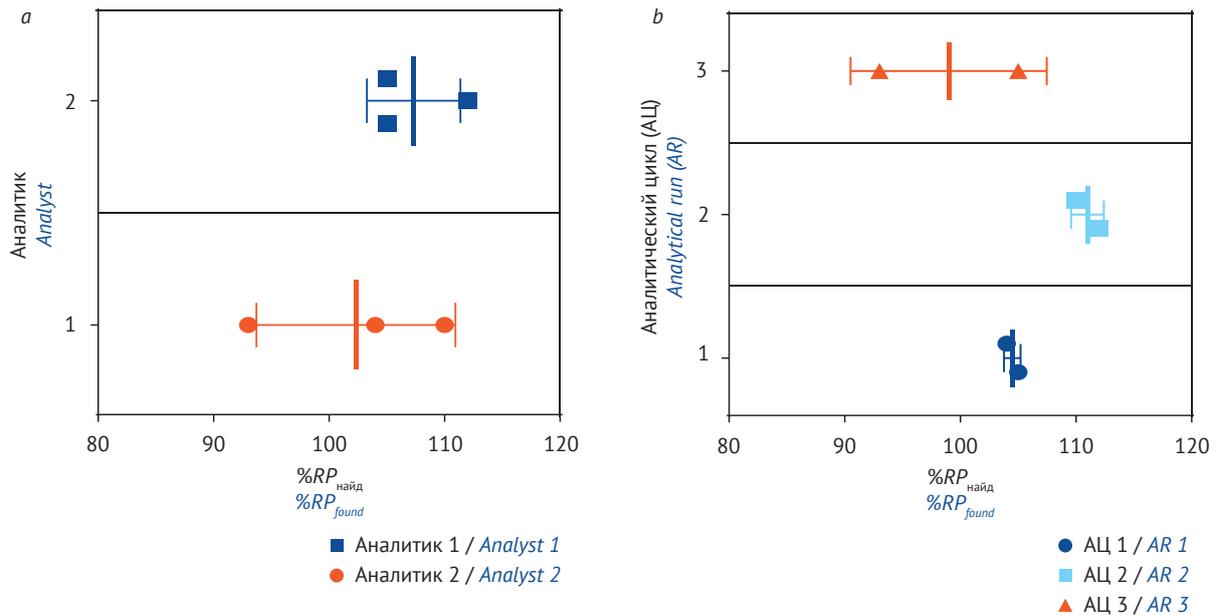


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

**Рис. 3.** Разброс значений относительной специфической активности (RP), полученных при тестировании методики по критериям: а – сходимость, б – «воспроизводимость между аналитиками». АЦ – аналитический цикл

**Fig. 3.** Scatter of relative potency values (RP) measured in analytical procedure validation for: a, repeatability, and b, intermediate precision (different analysts). AR, analytical run

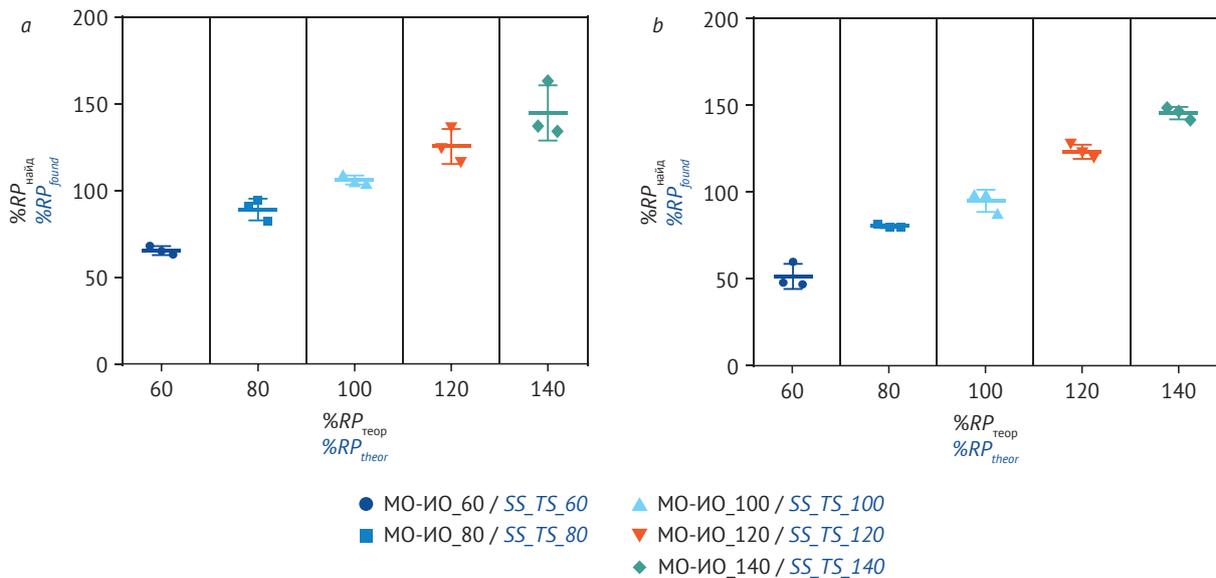


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

**Рис. 4.** Разброс значений относительной специфической активности (RP), полученных при тестировании методики по критерию «воспроизводимость между днями»: а – результаты аналитика 1, б – результаты аналитика 2. МО-ИО\_N – испытуемый образец с симулированной активностью N

**Fig. 4.** Scatter of relative potency values (RP) measured in analytical procedure validation for intermediate precision (different days): a, Analyst 1, and b, Analyst 2. SS\_TS\_N, test sample simulating activity N

в испытании внутрилабораторной прецизионности между днями представлен на рисунке 4. Средние значения RP, SD и CV<sub>RP</sub> представлены в таблице 2 «Средние значения относительной

специфической активности и коэффициенты вариации полученные двумя аналитиками в тесте «воспроизводимость между днями», опубликованной на сайте журнала<sup>5</sup>.

<sup>5</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table2>

При оценке внутрилабораторной прецизионности максимальное значение  $CV_{RP}$  составило 9% для прецизионности между аналитиками и 14% для прецизионности между днями. Полученные результаты соответствовали требованиям, предъявляемым к прецизионности методики.

Под правильностью методики понимают близость полученных значений к значениям, принимаемым за истинные. Согласно Государственной фармакопее Российской Федерации валидируемая методика соответствует критерию «правильность», если значения, принимаемые за истинные ( $RP_{теор}$ ), лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике ( $RP_{найд}$ )<sup>6</sup>. В нормативных документах нет четких указаний к определению правильности клеточных тестов для оценки специфической активности биологических ЛС. В своей работе мы опирались на рекомендации для методик, основанных на оценке связывания лиганда (ligand-binding assay, LBAs), как наиболее близких к клеточным тестам. Согласно рекомендациям<sup>7</sup>, разброс значений между тестируемым и номинальным значением измеряемого показателя не должен превышать 20%. Для образцов нижнего (НПКО) и верхнего (ВКПО) пределов количественного определения разброс значений может возрастать до 25%<sup>8</sup>. То есть значение коэффициента  $R_{sc}$ , вычисленного по формуле 2, для тестируемой пробы должно находиться в диапазоне 80–120%, а в случае НПКО и ВКПО – в диапазоне 75–125%. В описанной методике МО-ИО\_60 рассматривали как НПКО, а МО-ИО-140 как ВКПО, поэтому разброс значений ( $CV_{Rc}$ ) допускался до 25%, для остальных МО-ИО  $CV_{Rc}$  не должен был превышать 20%.

Результаты валидационных испытаний по критерию «правильность» считали приемлемыми, если соблюдались следующие условия:

- значение  $R_c$  для МО с симулированной активностью от 80 до 120% должно находиться в диапазоне от 80 до 120% включительно;
- значение  $R_c$  для МО с симулированной активностью 60 и 140% должно быть в диапазоне от 75 до 125% включительно;

- значения  $R_c$  для «слепой пробы» должны находиться в диапазоне от 80 до 120% или от 75 до 125% включительно;
- теоретические значения  $RP$  должны находиться внутри доверительных интервалов средних найденных значений  $RP$ .

Средние значения  $R_c$ ,  $SD_{Rc}$ ,  $CV_{Rc}$ , а также границы 95% доверительных интервалов (95% ДИ) для каждого МО-ИО с симулированной активностью представлены в *таблице 3 «Результаты валидационных испытаний на соответствие методики критерию “правильность” с использованием модельных образцов»*<sup>9</sup>, результаты тестирования «слепой пробы» – в *таблице 4 «Результаты валидационных испытаний на соответствие методики критерию “правильность” с использованием “слепой пробы”*», опубликованных на сайте журнала<sup>10</sup>. Значения  $R_c$  МО-ИО с симулированной активностью от 60 до 140%, в том числе результатов анализа «слепой пробы», находились в диапазоне 80–120% от номинальной активности.

Соответствие полученных данных установленным требованиям к критерию «правильность» позволило нам сделать вывод, что разработанная методика характеризуется приемлемой правильностью в аналитическом диапазоне от 60 до 140% номинальной активности препарата.

Для подтверждения линейной зависимости аналитического сигнала от количества определяемого вещества в пределах аналитической области методики<sup>11</sup> строили графики линейной регрессии и графики остатков, аппроксимируя значения измеренной активности препарата ( $RP_{найд}$ ) от ожидаемой величины ( $RP_{теор}$ ) в МО с симулированной активностью от 60 до 140%. Определение линейности методики проводили, используя данные, полученные в испытаниях «воспроизводимости между днями». Считали, что методика соответствует критерию «линейность» при соблюдении следующих условий:

- значение  $R^2$  должно быть не менее 0,95 ( $R^2 \geq 0,95$ );
- значение коэффициента  $k$  в уравнении линейной регрессии  $y=kx \pm b$  должно быть в диапазоне  $0,8 \leq k \leq 1,2$ ;
- график остатков должен носить случайный характер распределения.

<sup>6</sup> ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

<sup>7</sup> Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. EMA; 2011.

Bioanalytical method validation. Guidance for industry. FDA; 2018.

ICH M10 on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/ICH/172948/2019 EMA; 2023.

<sup>8</sup> Там же.

<sup>9</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table3>

<sup>10</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table4>

<sup>11</sup> ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

Значение коэффициента  $R^2$  составило 0,9973 для результатов аналитика 1, и 0,9916 – у аналитика 2. Уравнение линейной зависимости по результатам аналитика 1 было выражено как  $y=0,9800x+8,00$  и у аналитика 2 как  $y=1,155x-15,90$ . По усредненным результатам двух аналитиков  $y=1,060x-3,000$ . Графики остатков демонстрировали случайный характер распределения. Таким образом, было показано, что методика характеризуется приемлемой линейностью в аналитическом диапазоне от 60 до 140% номинальной активности препарата.

Для анализа устойчивости методики при вероятных небольших отклонениях от оптимальных условий проведения анализа<sup>12</sup> тестировали возможные изменения критичных компонентов биоаналитической системы: 1) другой пассаж репортерных клеток; 2) другой лот ИЛ-6; 3) другой лот реагента для детекции SEAP.

Для оценки влияния пассажа клеток на определение  $RP$  проводили три независимых аналитических цикла с использованием клеток 6-го, 7-го и 10-го пассажей. Для анализа влияния лота ИЛ-6 было выполнено по одному независимому аналитическому циклу для каждого лота. По аналогии с ИЛ-6 было проверено влияние лота реагента для детекции SEAP. Все аналитические циклы в исследовании устойчивости были проведены одним аналитиком с использованием МО-ИО<sub>100</sub>. Методику считали устойчивой, если при смене компонентов аналитической системы значение  $R_c$  для МО<sub>100</sub> находилось в интервале от 80 до 120%, а  $CV_{Rc}$  не превышал 20%.

При использовании клеток 6, 7 и 10-го пассажей  $R_c$  составлял 115, 105 и 110% соответственно,  $CV_{Rc}$  составлял 5%. При замене лотов ИЛ-6  $R_c$  составлял 97 и 96% для лота 1 и 2 соответственно, а  $CV_{Rc}$  был равен 1%. Значения  $R_c$  при использовании лотов 1 и 2 реагента для детекции SEAP были равны 97 и 93%,  $CV_{Rc}$  между этими значениями – 3%.

Поскольку значения  $R_c$  при изменении перечисленных компонентов системы находились в пределах от 80 до 120%,  $CV_{Rc}$  не превышал 20%, был сделан вывод об устойчивости методики при использовании диапазона пассажа клеток с 6 по 10 и при замене лотов ИЛ-6 и реагента для детекции SEAP.

#### **Расчет критериев приемлемости результатов.**

До начала валидационных испытаний нами были разработаны предварительные (установленные до анализа) критерии пригодности системы

и критерии приемлемости результатов анализа для ИО, а также установлены их допустимые значения. Результаты, полученные в испытаниях, были статистически обработаны, и для каждого критерия были установлены предельно допустимые значения (табл. 5).

Систему считали пригодной, если  $R^2$  кривой СО был выше или равен 0,95, а  $CV_{оп}$  для каждого разведения СО, положительного и отрицательного контрольных образцов не превышал 20%. Минимальное значение  $R^2$  СО составило 0,9965, а максимальное значение  $CV_{оп}$  СО, (К+) и (К-) было 15%. По результатам валидационных испытаний нижнюю границу  $R^2$  СО оставили на значении 0,95, а верхнюю границу  $CV_{оп}$  СО, (К+) и (К-) снизили до 15% (табл. 5).

Расчет  $RP$  МО-ИО проводили, если первичные результаты тестирования ИО соответствовали критериям приемлемости результатов для ИО. Критерии включали в себя оценку параллелизма дозозависимых кривых СО и ИО, а также минимального значения  $R^2$  ИО и максимального значения  $CV_{оп}$  разведений ИО. Дозозависимые кривые СО и ИО считали параллельными, если соотношения значений верхних и нижних асимптот находились в диапазоне 0,8–1,25, а соотношение углов наклона – в диапазоне 0,7–1,25. При этом значение  $R^2$  ИО должно было быть не ниже 0,95, а  $CV_{оп}$  для каждого разведения ИО – не выше 20%. Средние значения соотношений асимптот  $\pm 3SD$  составили  $1,02 \pm 0,16$  для верхних асимптот, для нижних асимптот  $0,99 \pm 0,07$  и для углов наклона  $1,01 \pm 0,15$ . Параллелизм дозозависимых кривых СО и ИО был подтвержден. Минимальное значение  $R^2$  ИО было 0,9967, максимальное значение  $CV_{оп}$  ИО – 14%. Границы критериев параллелизма дозозависимых кривых и минимальное значение  $R^2$  ИО оставлены без изменений, а верхняя граница  $CV_{оп}$  разведений ИО снижена до 15%.

Однако более полная характеристика правильности работы системы в каждом аналитическом цикле требует расширения перечня критериев ее пригодности. Поскольку в основе методики лежит дозозависимый ответ репортерных клеток HEK-Blue™ IL-6 на ИЛ-6, дополнительные критерии пригодности системы должны характеризовать этот ответ. К таким характеристикам относили: 1) подтверждение активирующего действия ИЛ-6 на индукцию щелочной фосфатазы и отсутствие ИЛ-6-независимой секреции; 2) полное ингибирование сигнала ИЛ-6 при инкубации клеток HEK-Blue™ IL-6 с минимальными

<sup>12</sup> Там же.

Таблица 5. Сводная таблица рассчитанных критериев приемлемости результатов анализа

Table 5. Summary table of calculated acceptance criteria for test results

Показатель <i>Parameter</i>	Предварительное значение критерия <i>Preliminary criteria</i>	Принцип установления критерия <i>Setting principle</i>	Установленные границы <i>Established limits</i>
Критерии пригодности системы <i>System suitability criteria</i>			
$\frac{\overline{OP}_{K+} - \overline{OP}_{K-}}{OD_{K+} - OD_{K-}}$	Не определено <i>Not determined</i>	Не ниже минимального <i>NLT minimum</i>	≥0,31
$\frac{\overline{OP}_{\text{минимальные разведения CO}}}{\overline{OP}_{K+}}$ $\frac{\overline{OP}_{RS \text{ minimum dilution}}}{\overline{OP}_{K+}}$	Не определено <i>Not determined</i>	Не выше максимального <i>NMT maximum</i>	≤1,0
$\frac{\overline{OP}_{\text{максимальные разведения CO}}}{\overline{OP}_{K-}}$ $\frac{\overline{OP}_{RS \text{ maximum dilution}}}{\overline{OP}_{K-}}$	Не определено <i>Not determined</i>	Не ниже минимального <i>NLT minimum</i>	≥0,72
$\frac{\overline{OP}_{\text{верхняя асимптота CO}} - \overline{OP}_{\text{нижняя асимптота CO}}}{OD_{RS \text{ upper asymptote}} - OD_{RS \text{ lower asymptote}}}$	Не определено <i>Not determined</i>	Не ниже минимального <i>NLT minimum</i>	≥0,42
Коэффициент вариации ОП СО, (K+) и (K-), % <i>Coefficient of variation for RS OD values, (K+) and (K-), %</i>	Не определено <i>Not determined</i>	Не выше максимального <i>NMT maximum</i>	≤15
Коэффициент детерминации (R <sup>2</sup> ) СО, % <i>RS coefficient of determination (R<sup>2</sup>), %</i>	Не менее 0,95 <i>NLT 0.95</i>	Не ниже минимального <i>NLT minimum</i>	≥0,95
Критерии приемлемости результатов анализа для ИО <i>Acceptance criteria for TS testing results</i>			
Соотношение значений верхних асимптот СО и ИО <i>Correlation of RS and TS upper asymptote values</i>	0,8–1,25	Среднее±3SD <i>Mean±3SD</i>	0,86–1,18
Соотношение значений нижних асимптот СО и ИО <i>Correlation of RS and TS lower asymptote values</i>	0,8–1,25	Среднее±3SD <i>Mean±3SD</i>	0,92–1,06
Соотношение значений углов наклона СО и ИО <i>Correlation of RS and TS slope values</i>	0,8–1,25	Среднее±3SD <i>Mean±3SD</i>	0,86–1,16
Коэффициент вариации ОП ИО, % <i>Coefficient of variation for TS OD values, %</i>	Не определено <i>Not determined</i>	Не выше, чем среднее±3SD <i>NMT mean±3SD</i>	≤15
Коэффициент детерминации (R <sup>2</sup> ) ИО, % <i>TS coefficient of determination (R<sup>2</sup>), %</i>	Не менее 0,95 <i>NLT 0.95</i>	Не ниже минимального <i>NLT minimum</i>	≥0,95

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

**Примечание.**  $\overline{OP}(X)$  – среднее значение плотности соответствующего образца «X», K+ и K- – положительный и отрицательный контрольные образцы соответственно, СО – стандартный образец, ИО – испытуемый образец, SD – стандартное отклонение.

**Примечание.**  $\overline{OD}(X)$ , mean optical density of the corresponding sample (X); K+, positive control; K-, negative control; RS, reference standard; TS, test sample; SD, standard deviation; NMT, not more than; NLT, not less than.

разведениями СО; 3) отсутствие ингибирования при инкубации с максимальными разведениями СО; 4) разницу средних значений ОП верхней и нижней асимптот СО.

Для подтверждения активирующего действия ИЛ-6 и отсутствия спонтанной секреции рассчитывали разницу между средними значениями ОП положительного и отрицательного контрольных образцов ( $\overline{OP}_{K+}$  и  $\overline{OP}_{K-}$ ). Полное ингибирование сигнала ИЛ-6 тоцилизумабом определяли

по отношению средних значений ОП лунок с максимальным разведением СО к средним значениям лунок  $\overline{OP}_{K-}$ , а отсутствие ингибирующего действия – по отношению средних значений ОП лунок с минимальным разведением СО к средним значениям лунок  $\overline{OP}_{K+}$ . Также для подтверждения ингибирующего действия тоцилизумаба в зависимости от дозы рассчитывали разницу средних значений ОП верхних и нижних асимптот СО.

Минимальное значение разницы средних значений ОП<sub>к+</sub> и ОП<sub>к-</sub> составило 0,31. Максимальное значение соотношения средних значений ОП лунок минимального разведения СО и К+ было равным 1,0, а минимальное значение соотношения средних значений ОП лунок максимального разведения СО и К- составляло 0,72. Минимальное значение разницы ОП лунок максимального (верхняя асимптота) и минимального (нижняя асимптота) разведений составляло 0,42. Полученные значения были приняты в качестве границ критериев пригодности системы (табл. 5).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлены результаты валидации методики определения специфической активности GNR-087 с использованием репортерной клеточной линии НЕК-Blue™ IL-6, а также расчет количественных границ критериев пригодности системы и критериев приемлемости результатов анализа. Показано, что количественные границы критериев по мере накопления дополнительных данных могут быть ужесточены.

Валидационные испытания подтвердили, что разработанная методика оценки биологической активности лекарственных средств на основе тоцилизумаба, основанная на ингибировании ИЛ-6 зависимой секреции эмбриональной щелочной фосфатазы SEAP, измеряемой спектрофотометрически, обладает приемлемой специфичностью, правильностью, повторяемостью, внутрилабораторной прецизионностью и линейностью в аналитическом диапазоне от 60 до 140% от номинальной активности препарата.

Специфичность методики подтверждена дозозависимым ингибированием тоцилизумабом ИЛ-6-зависимой секреции SEAP и отсутствием ингибирования при действии омализумаба. Методика прецизионна – вариабельность результатов при исследовании сходимости составила 8 и 4% соответственно у аналитиков 1 и 2 и 14% при исследовании «воспроизводимости между аналитиками». Подтверждена правильность методики – значение коэффициента выявления ( $R_c$ ) модельных образцов со симулированной активностью в диапазоне от 60 до 140% и «слепых проб» находились в диапазоне от 80 до 120%, а теоретические значения относительной специфической активности ( $RP$ ) находились внутри доверительных интервалов средних найденных значений  $RP$ . Методика линейна, что подтверждено значениями коэффициента детерминации  $R^2 \geq 0,99$ , значение коэффициента  $k$  в уравнении линейной регрессии находилось в диапазоне от 0,8 до 1,2 и графики остатков демонстрировали случайный характер распределения. Показана устойчивость методики к использованию репортерных клеток разных пассажей (от 6-го до 10-го) ( $CV_{RP} = 10\%$ ), замене лотов ИЛ-6 ( $CV_{RP} = 1\%$ ) и реагента для детекции SEAP ( $CV_{RP} = 3\%$ ), при этом значение  $R_c$  во всех случаях находилось в диапазоне 80–120% от номинального значения  $RP$ .

Разработанная методика может служить как для рутинного контроля биологической активности, так и для использования в исследованиях при доказательстве биоподобия разрабатываемых препаратов оригинальному (референтному) препарату на основе тоцилизумаба.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones S. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol.* 2006;80(2):227–36. <https://doi.org/10.1189/jlb.1105674>
- Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, Mysler EF, da Silva NA, Alecock E, et al. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum.* 2008;58(10):2968–80. <https://doi.org/10.1002/art.23940>
- Насонов ЕЛ. Иммунопатология и иммунофармакотерапия коронавирусной болезни 2019 (COVID-19): фокус на интерлейкин 6. *Научно-практическая ревматология.* 2020;58(3):245–61. Nasonov EL. Immunopathology and immunopharmacotherapy of coronavirus disease 2019 (COVID-19): focus on interleukin 6. *Rheumatology Science and Practice.* 2020;58(3):245–61 (In Russ.). <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2020-245-261>
- Sebba A. Tocilizumab: The first interleukin-6-receptor inhibitor. *Am J Health Syst Pharm.* 2008;65(11):1413–8. <https://doi.org/10.2146/ajhp070449>
- White J, Abodeely M, Ahmed S, Debaube G, Johnson E, Meyer D, et al. Best practices in bioassay development to support registration of biopharmaceuticals. *Biotechniques.* 2019;67(3):126–37. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0031>
- Miao S, Fan L, Zhao L, Ding D, Liu X, Wang H, Tan WS. Physicochemical and biological characterization of the proposed biosimilar tocilizumab. *Biomed Res Int.* 2017;2017:4926168. <https://doi.org/10.1155/2017/4926168>
- Robinson J, Sadick M, Deming S, Estdale S, Bergelson S, Little L. Assay acceptance criteria for multiwell-plate-based biological potency assays. *BioProcess Int.* 2014;12(1):30–41.
- Little TA, Harding DS. Establishing systems suitability and validity criteria for analytical methods and bioassays. *BioPharma Outsourcing Innovation, Pharmaceutical Technology* (February 2022). <https://www.pharmtech.com/view/establishing-systems-suitability-and-validity-criteria-for-analytical-methods-and-bioassays>

**Дополнительная информация.** На сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» размещены таблицы 2–4.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table2>

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table3>

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table4>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Ю.А. Никонова – выполнение валидационных испытаний, анализ полученных результатов, расчет критериев приемлемости, написание текста рукописи; С.Г. Аббасова – разработка концепции исследования, анализ полученных результатов, расчет критериев приемлемости, написание и редактирование текста рукописи; П.Е. Каргополова – выполнение валидационных испытаний; О.М. Стрижакова – разработка методики оценки биологической активности тоцилизумаба, критический пересмотр текста рукописи; И.В. Лягоскин – критический пересмотр текста рукописи, анализ полученных результатов, согласование и утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; А.П. Васильев – разработка методики оценки биологической активности тоцилизумаба; А.С. Першин – критический пересмотр текста рукописи, согласование и утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

**Additional information.** Tables 2–4 are posted on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table2>

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table3>

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table4>

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Yulia A. Nikonova performed validation tests, analysed the results obtained, calculated acceptance criteria, and drafted the manuscript. Svetlana G. Abbasova conceptualised the study, analysed the results obtained, calculated acceptance criteria, drafted and edited the manuscript. Polina E. Kargopolova performed validation tests. Olga M. Strizhakova developed the analytical procedure for assessing the biological activity of tocilizumab and critically revised the manuscript. Ivan V. Lyagoskin critically revised the manuscript, analysed the results obtained, coordinated approvals and approved the final version of the manuscript for publication. Alexandr P. Vasilev developed the analytical procedure for assessing the biological activity of tocilizumab. Andrey S. Pershin critically revised the manuscript, coordinated approvals and approved the final version of the manuscript for publication.

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Никонова Юлия Александровна / Yulia A. Nikonova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-9522-2587>

Аббасова Светлана Георгиевна, д-р биол. наук / Svetlana G. Abbasova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5841-7587>

Каргополова Полина Евгеньевна / Polina E. Kargopolova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4132-5971>

Стрижакова Ольга Михайловна, канд. вет. наук / Olga M. Strizhakova, Cand. Sci. (Vet.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0023-0028>

Лягоскин Иван Владимирович, канд. биол. наук / Ivan V. Lyagoskin, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9058-1106>

Васильев Александр Павлович, канд. биол. наук / Alexandr P. Vasilev, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-1418-6528>

Першин Андрей Сергеевич, канд. вет. наук / Andrey S. Pershin, Cand. Sci. (Vet.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5099-3050>

Поступила 20.12.2023

После доработки 01.04.2024

Принята к публикации 10.04.2024

Received 20 December 2023

Revised 1 April 2024

Accepted 10 April 2024



Т.А. Батуашвили   
Е.О. Чечетова    
П.В. Шадрин   
Н.П. Неугодова 

## Определение биологической активности гонадотропинов на крысах беспородных и линии Sprague Dawley. Часть 2. Определение биологической активности лютеинизирующего гормона

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

 Чечетова Екатерина Олеговна; [stepanuk@expmed.ru](mailto:stepanuk@expmed.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Тенденция к сокращению использования лабораторных животных при оценке качества лекарственных препаратов, а также появление новых технологий получения гонадотропных препаратов обуславливают необходимость разработки новых методик определения биологической активности природных и рекомбинантных препаратов передней доли гипофиза.

**ЦЕЛЬ.** Выбор оптимальных условий определения биологической активности лютеинизирующего гормона в мочевых и генно-инженерных препаратах в испытаниях на крысах беспородных и линии Sprague Dawley.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Определение величины биологической активности мочевых и рекомбинантных препаратов лютеинизирующего гормона (ЛГ) проводили трехдозовым рандомизированным методом *in vivo* по схеме Steelman and Pohley путем сравнения биологической активности испытуемых и стандартных (СО) образцов. Для анализа были использованы результаты, полученные в течение двух лет. В качестве СО использовали стандарт ВОЗ, содержащий 183 МЕ фолликулостимулирующего гормона и 177 МЕ ЛГ/амп. Испытание проводили на неполовозрелых крысах-самцах беспородных и линии Sprague Dawley. В зависимости от статуса крыс выбирали условия проведения испытания.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Проведен сравнительный анализ результатов определения активности ЛГ *in vivo* на крысах-самцах по интегральному показателю  $s/b$ , позволяющему оценить одновременно разброс ответов и дозозависимость. Было показано, что использование самцов крыс линии Sprague Dawley ( $s/b=0,82\pm 0,44$ ) для определения биологической активности ЛГ возможно наравне с беспородными животными ( $s/b=0,68\pm 0,58$ ). Значения показателей  $s/b$  близки, несмотря на то что количество животных линии Sprague Dawley в испытаниях было в два раза меньше.

**ВЫВОДЫ.** Показана возможность определения биологической активности ЛГ в препаратах менотропинов не только на беспородных, но и на линейных крысах-самцах. Проведение испытания на крысах линии Sprague Dawley позволяет подтвердить достоверность результатов, используя меньшее количество животных, что, в свою очередь, является не только гуманным, но и более выгодным экономически.

**Ключевые слова:** гонадотропные гормоны; менотропины; рекомбинантные гонадотропины; лютеинизирующий гормон; биологическая активность; крысы беспородные; Sprague Dawley; линейные крысы; лабораторные животные

**Для цитирования:** Батуашвили Т.А., Чечетова Е.О., Шадрин П.В., Неугодова Н.П. Определение биологической активности гонадотропинов на крысах беспородных и линии Sprague Dawley. Часть 2. Определение биологической активности лютеинизирующего гормона. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2024;14(3):330–337. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-330-337>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0).

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Tamara A. Batuashvili   
Ekaterina O. Chechetova  ✉  
Pavel V. Shadrin   
Natalia P. Neugodova 

## Determination of Biological Activity of Gonadotrophins in Rando bred and Sprague Dawley Rats. Part 2. Determination of Biological Activity of Luteinising Hormone

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

✉ Ekaterina O. Chechetova; [stepanuk@expmed.ru](mailto:stepanuk@expmed.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** The tendency towards reducing the use of laboratory animals in pharmaceutical quality assessment, along with the development of new technologies for gonadotrophin production, necessitate the development of novel assays to determine the biological activity of natural and recombinant anterior pituitary preparations.

**AIM.** This study aimed to select the optimum conditions for the determination of the biological activity of luteinising hormone (LH) in urinary and genetically engineered LH preparations by tests in rando bred and Sprague Dawley rats.

**MATERIALS AND METHODS.** The biological activity of urinary and recombinant LH preparations was determined *in vivo* in a three-dose randomised Steelman–Pohley bioassay, which compared the biological activity of the test samples to a reference standard (RS). The analysis used two years' worth of test results. The RS used was the WHO international standard containing 183 IU of follicle stimulating hormone bioactivity and 177 IU of LH bioactivity per ampoule. The bioassay was performed in immature male rando bred and Sprague Dawley rats; the bioassay conditions were selected according to the rat type.

**RESULTS.** The results of the *in vivo* determination of LH biological activity in male rats were compared by the standard deviation to slope ratio ( $s/b$ ), which helps estimate response variation and dose dependence at the same time. The study demonstrated the possibility of using Sprague Dawley rats ( $s/b=0.82\pm 0.44$ ) for the determination of LH biological activity along with rando bred animals ( $s/b=0.68\pm 0.58$ ). The  $s/b$  ratios were close, although Sprague Dawley rats and rando bred rats were used in the assay at a 1:2 ratio.

**CONCLUSIONS.** It is possible to determine the biological activity of LH from menopausal gonadotrophin preparations in both rando bred and Sprague Dawley male rats. The use of Sprague Dawley rats for testing can confirm the reliability of test results using fewer animals than needed for standard tests; this is not only humane but also cost effective.

**Keywords:** gonadotrophic hormones; menopausal gonadotrophins; recombinant gonadotrophins; luteinising hormone; biological activity; rando bred rats; Sprague Dawley; laboratory animals

**For citation:** Batuashvili T.A., Chechetova E.O., Shadrin P.V., Neugodova N.P. Determination of biological activity of gonadotrophins in rando bred and Sprague Dawley rats. Part 2. Determination of biological activity of luteinising hormone. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):331–337. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-331-337>

**Funding.** The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00026-24-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 124022300127-0).

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Для успешного фолликулогенеза наряду с фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ) в состав мочевых и рекомбинантных гонадотропных препаратов входит лютеинизирующий гормон (ЛГ) – гликопротеин, состоящий из двух субъединиц, биологические свойства которого определяет  $\beta$ -субъединица. Молекулы ЛГ отличаются от ФСГ наличием сульфидных мостиков. В организме секреция гормона происходит под воздействием гонадолиберина (гонадотропин-рилизинг-гормон), который синтезируется в гипоталамусе. Помимо участия в выработке эстрогенов, прогестерона и тестостерона ЛГ способствует формированию желтого тела, процессу овуляции, а также созреванию фолликулов [1].

Как и хорионический гонадотропин человека, ЛГ обладает лютеинизирующей активностью, но имеет существенные молекулярные и функциональные отличия, которые хорошо улавливает рецептор, находящийся на гранулезных клетках и взаимодействующий с обоими гормонами. Только гетеродимерные полностью гликозилированные формы гормонов способны проявлять биологическую активность (БА). По этой причине для получения рекомбинантных гормонов пригодны только культивируемые клетки млекопитающих, в которых происходит корректное гликозилирование целевых белков [2, 3]. Учитывая особенности и технологии получения мочевых и рекомбинантных гонадотропинов, требуется обязательный контроль биологической активности препаратов данной группы.

Большинство препаратов группы менотропинов содержат ЛГ и ФСГ в соотношении 1:1 или 1:2<sup>1</sup>. Однако рекомбинантные гонадотропные препараты выпускают как в виде монопрепаратов (содержащих либо рекомбинантный ФСГ (рФСГ), либо рекомбинантный ЛГ (рЛГ), так и в виде препаратов содержащих оба гормона (рФСГ и рЛГ).

Цель работы – выбор оптимальных условий определения биологической активности лютеинизирующего гормона в мочевых и генно-инженерных препаратах в испытаниях на крысах беспородных и линии Sprague Dawley.

Задачи исследования:

- изучение чувствительности крыс линии Sprague Dawley в сравнении с беспородными животными к ЛГ;
- оценка возможности использования крыс линии Sprague Dawley в определении биологической активности препаратов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение величины биологической активности ЛГ проводили биологическим трехдозовым рандомизированным методом по схеме Steelman and Pohley, сравнивая биологическую активность испытуемого образца (ИО) со стандартным образцом (СО) [4].

В качестве СО использовали стандарт ВОЗ, содержащий 183 МЕ ФСГ и 177 МЕ ЛГ/амп. (кат. №10/286)<sup>2</sup>. Испытания проводили с использованием крыс-самцов беспородных<sup>3</sup> и линии Sprague Dawley<sup>4</sup>. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Доступ к воде и пище был свободным. Все манипуляции на животных проводили в соответствии с требованиями нормативных документов<sup>5</sup>. Масса крыс на начало опыта составляла 32–36 г. В качестве ответа принимали относительную массу органа (ОМО), в данном случае – комплекса добавочных половых желез ( $m_{\text{органа}}/m_{\text{тела}}$ , мг/г).

В качестве растворителя для приготовления растворов в рабочих концентрациях использовали альбумино-фосфатный буфер<sup>6</sup>.

В испытание брали шесть групп животных, в каждой из которых было от 5 до 10 крыс в зависимости от выбранной методики. Во время проведения опыта ежедневно в течение четырех суток крысы получали подкожные инъекции 1 раз/сут в одно и то же время. Трех группам вводили растворы СО (малая, средняя, большая дозы), а трем другим – ИО соответственно. Курсовые дозы, полученные каждым животным в течение опыта, соответствовали требованиям выбранной методики (табл. 1, 2). На пятый день проводили эвтаназию и выделяли комплекс добавочных половых желез. Очищенные и просушенные фильтровальной бумагой органы взвешивали и вычисляли ОМО. БА рассчитывали в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации<sup>7</sup>.

<sup>1</sup> <https://www.rlsnet.ru/active-substance/menotropiny-757>

<sup>2</sup> [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/blood-products/catalogue/alphabetical-list.pdf?sfvrsn=15455482\\_2](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/blood-products/catalogue/alphabetical-list.pdf?sfvrsn=15455482_2)

<sup>3</sup> ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, Филиал «Андреевка».

<sup>4</sup> НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН.

<sup>5</sup> СП 2.2.1.3218-14 Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). 2014.

<sup>6</sup> ОФС.1.2.4.0014.18 Биологические испытания гонадотропинов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

<sup>7</sup> ОФС.1.1.0014.15 Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

**Таблица 1.** Реакция беспородных самцов крыс на введение стандартного образца лютеинизирующего гормона (добавочные половые железы)**Table 1.** Responses of male randombred rats to the international standard for luteinising hormone (accessory sex organs)

Курсовая доза лютеинизирующего гормона, МЕ/животное <i>Accumulated luteinising hormone dose, IU/animal</i>	Среднее значение относительной массы органов (ОМО) и полуширина доверительного интервала ( $\overline{ОМО} \pm \Delta ОМО$ ) при доверительной вероятности $P=95\%$ <i>Average accessory sex organ-to-body weight ratio and confidence interval half-width (<math>\overline{ОМО} \pm \Delta ОМО</math>) (P=95%)</i>
4,5	1,45±0,11
16,5	1,60±0,07
39,0	1,86±0,12

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Таблица 2.** Реакция самцов крыс линии Sprague Dawley на введение стандартного образца лютеинизирующего гормона (добавочные половые железы)**Table 2.** Responses of male Sprague Dawley rats to the international standard for luteinising hormone (accessory sex organs)

Курсовая доза лютеинизирующего гормона, МЕ/животное <i>Accumulated luteinising hormone dose, IU/animal</i>	Среднее значение относительной массы органов (ОМО) и полуширина доверительного интервала ( $\overline{ОМО} \pm \Delta ОМО$ ) при доверительной вероятности $P=95\%$ <i>Average accessory sex organ-to-body weight ratio and confidence interval half-width (<math>\overline{ОМО} \pm \Delta ОМО</math>) (P=95%)</i>
4,5	1,29±0,07
14,3	1,92±0,16
35,0	2,24±0,26

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

В общей сложности в течение двух лет было использовано 360 беспородных и 180 животных линии Sprague Dawley.

На первом этапе была проведена оценка собранных за весь период проведения испытания данных, характеризующих ответ животных беспородных и линии Sprague Dawley на подкожное введение СО ЛГ при определении БА менотропинов. Графики зависимости эффекта от дозы проанализировали по тангенсу угла наклона (коэффициенту регрессии  $b$ ) и разбросу (дисперсии  $s^2$ ). Чем больше угол наклона линии, тем выше дозозависимость; чем меньше дисперсия результатов в испытании, тем они более точны и воспроизводимы. Для крыс каждого статуса вычисляли интегральный коэффициент  $s/b$ . Чем меньше его значение, тем выше чувствительность крыс.

Вторым этапом работы стал анализ ответов, полученных при определении БА (сравнение ИО с СО) различных препаратов менотропинов на беспородных и линейных животных. Регрессионный и дисперсионный анализ данных, а также вычисление БА ЛГ проводили с помощью электронных таблиц Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке данных СО ЛГ величины курсовых доз и соответствующие ответы животных, в которых значения ОМО различались

статистически незначимо, усреднили и объединили. Полученные результаты представлены в *таблицах 1, 2* и на *рисунке 1*.

Следующим этапом исследования была оценка статистической значимости дозозависимости с помощью дисперсионного анализа и ее сравнение для крыс беспородных и линии Sprague Dawley, получавших СО ЛГ.

Для применения модели параллельных прямых дозозависимость должна быть линейна и статистически значима. Эти параметры характеризуют источники дисперсии – показатели «Нелинейность» и «Регрессия» соответственно. Наблюдаемое значение критерия Фишера для первого показателя должно быть меньше, а для второго – больше критического.

Дисперсионный анализ полученных линий регрессии показал наличие статистически значимой дозозависимости и незначимой нелинейности (*табл. 3, 4*) для реакции животных на введение растворов СО ЛГ [5].

На основании полученных данных (*табл. 1, 2*) был проведен анализ линий дозозависимости СО ЛГ беспородных и линейных крыс [6]. Сравнить коэффициенты регрессии с помощью  $t$ -критерия не представлялось возможным, так как линии характеризовались разным разбросом (*рис. 1, табл. 1, 2*). При этом дисперсия дозозависимости

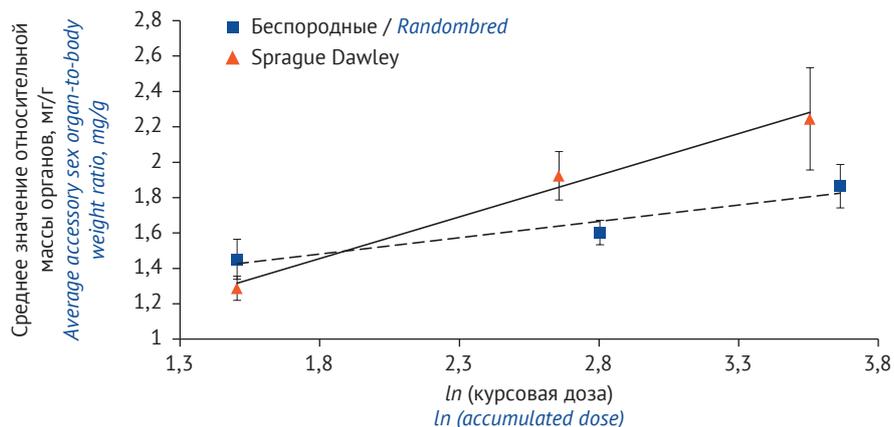


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

**Рис. 1.** Объединенная реакция крыс-самцов беспородных и линии Sprague Dawley на введение стандартного образца лютеинизирующего гормона с линейной аппроксимацией

**Fig. 1.** Pooled responses of male randombred and Sprague Dawley rats to the international standard for luteinising hormone, with linear approximation

животных линии Sprague Dawley была значительно выше, чем у беспородных ( $F_{набл} > F_{критич}$ ). Поэтому о непараллельности линий дозозависимости реакции крыс беспородных и линии Sprague Dawley на введение СО ЛГ судили по непересекающимся доверительным границам коэффициентов регрессии  $b$ :  $0,16 \pm 0,07$  (беспородные животные) и  $0,47 \pm 0,15$  (линейные животные) при  $P=95\%$  (табл. 5) [5]. Интервалы доверительных границ не пересекаются, поэтому различие реакции животных следует считать статистически значимым (рис. 1). Следовательно, при введении СО ЛГ дозозависимость у животных линии

Sprague Dawley ( $P=95\%$ ) значительно выше, чем у беспородных (табл. 6) [6, 7].

Таким образом, у беспородных животных меньше разброс результатов, а у крыс линии Sprague Dawley выше дозозависимость. Для сравнительной оценки чувствительности крыс разных статусов применили интегральный коэффициент  $s/b$ , который характеризует баланс разброса ответов и степени дозозависимости. Чем ниже значение данного коэффициента, тем выше чувствительность. Значение для линейных животных составило 1,25, для беспородных – 1,93

**Таблица 3.** Результаты оценки реакции беспородных крыс-самцов на введение стандартного образца лютеинизирующего гормона (методом дисперсионного анализа)

**Table 3.** Analysis of variance of pooled responses of male randombred rats to the international standard for luteinising hormone

Определяемый показатель Test parameter	Число степеней свободы (f) Number of degrees of freedom (f)	Сумма квадратов Sum of squares	Средний квадрат Mean square	Значение критерия Фишера Fisher test value		Доверительная вероятность (P, %) Confidence probability (P, %)
				F <sub>набл</sub> F <sub>calculated</sub>	F <sub>критич</sub> F <sub>critical</sub>	
Регрессия Regression	1	1,94	1,94	19,41	6,83	99
Отклонение от регрессии (нелинейность) Departure from regression (non-linearity)	1	0,27	0,27	2,68	3,92	95
Постановки (межгрупповая дисперсия) Treatments (intergroup variance)	2	2,21	1,10	11,05	3,07	95
Отклонение (внутригрупповая дисперсия) Error (intragroup variance)	136	13,58	0,10	–	–	–
Итого ( $\Sigma_{yy}$ ) Total ( $\Sigma_{yy}$ )	138	15,79	0,11	–	–	–

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** «–» – не применимо.

**Note.** –, not applicable.

**Таблица 4.** Результаты оценки реакции крыс-самцов линии Sprague Dawley на введение стандартного образца лютеинизирующего гормона (методом дисперсионного анализа)

**Table 4.** Analysis of variance of pooled responses of male Sprague Dawley rats to the international standard for luteinising hormone

Определяемый показатель <i>Test parameter</i>	Число степеней свободы ( <i>f</i> ) <i>Number of degrees of freedom (f)</i>	Сумма квадратов <i>Sum of squares</i>	Средний квадрат <i>Mean square</i>	Значение критерия Фишера <i>Fisher test value</i>		Доверительная вероятность (P, %) <i>Confidence probability (P, %)</i>
				Fнабл <i>F<sub>calculated</sub></i>	Fкритич <i>F<sub>critical</sub></i>	
Регрессия <i>Regression</i>	1	12,56	12,56	37,64	6,86	99
Отклонение от регрессии (нелинейность) <i>Departure from regression (non-linearity)</i>	1	0,14	0,14	0,43	3,93	95
Постановки (межгрупповая дисперсия) <i>Treatments (intergroup variance)</i>	2	12,7	6,35	19,03	3,08	95
Отклонение (внутригрупповая дисперсия) <i>Error (intragroup variance)</i>	122	40,7	0,33	–	–	–
Итого ( $\Sigma_{yy}$ ) <i>Total (<math>\Sigma_{yy}</math>)</i>	124	53,41	0,43	–	–	–

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** «–» – не применимо.

**Note.** –, not applicable.

**Таблица 5.** Анализ линий регрессии, характеризующих реакцию крыс-самцов беспородных и линии Sprague Dawley на введение стандартного образца лютеинизирующего гормона

**Table 5.** Analysis of regression lines characterising responses of male randombred and Sprague Dawley rats to the international standard for luteinising hormone

Показатель <i>Parameter</i>	Значение показателя у животных <i>Parameter value in animals</i>		
	Беспородные <i>Randombred</i>	Sprague-Dawley	
Коэффициент линейной регрессии <i>b</i> <i>Slope, b</i>	0,16	0,47	
Дисперсия $s^2$ <i>Variance, s<sup>2</sup></i>	0,10	0,34	
Среднее значение натурального логарифма курсовой дозы $\bar{x}$ <i>Mean ln (accumulated dose) <math>\bar{x}</math></i>	2,55	2,64	
Средний ответ $\bar{y}$ <i>Mean response <math>\bar{y}</math>, mg/g</i>	81,59	81,87	
<i>Сравнение дисперсий <math>s^2</math></i> <i>Comparison of variances, s<sup>2</sup></i>			
$F_{набл} (F_{calculated})=3,37$	<i>f</i> большей дисперсии <i>f, maximum variance</i>	<i>f</i> меньшей дисперсии <i>f, minimum variance</i>	Дисперсии статистически значимо различаются <i>Significant difference between variances</i>
$F_{критич} (F_{critical})=1,34 (P=95\%)$	118	137	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** *F* – критерий Фишера; *f* – число степеней свободы.

**Note.** *F*, Fisher's test; *f*, number of degrees of freedom.

(табл. 6), что свидетельствует о более высокой чувствительности линейных животных к СО ЛГ.

Анализ результатов определения БА (сравнение ИО с СО) показал, что различие средних значений интегрального показателя

для животных обоих статусов ( $0,68 \pm 0,58$  и  $0,82 \pm 0,44$  для беспородных и линейных крыс соответственно) статистически незначимо при том, что число линейных животных в каждом испытании было в два раза меньше, чем беспородных. Таким образом, можно сделать

**Таблица 6.** Показатели, характеризующие реакцию крыс-самцов беспородных и линии Sprague Dawley на введение стандартного образца лютеинизирующего гормона

**Table 6.** Parameters characterising responses of male randombred and Sprague Dawley rats to the international standard of luteinising hormone

Показатель <i>Parameter</i>	Значение показателя в группе животных <i>Parameter value in the group of animals</i>	
	Беспородные <i>Randombred</i>	Sprague Dawley
Коэффициент линейной регрессии (опорное значение $\pm$ полуширина доверительного интервала $b \pm \Delta b$ , $P=95\%$ ) <i>Slope (average value <math>\pm</math> confidence interval half-width <math>b \pm \Delta b</math>, <math>P=95\%</math>)</i>	0,16 $\pm$ 0,07	0,47 $\pm$ 0,15
Дисперсия ( $s^2$ ) <i>Variance (<math>s^2</math>)</i>	0,10	0,34
Интегральный показатель $s/b$ <i>Standard deviation/slope ratio (<math>s/b</math>)</i>	1,93	1,25

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.**  $s$  – среднее квадратическое отклонение;  $P$  – доверительная вероятность.

**Note.**  $s$ , standard deviation;  $P$ , confidence probability.

вывод, что для сокращения числа животных при определении биологической активности ЛГ в препаратах менотропина возможно использовать крыс линии Sprague Dawley.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного анализа установлено, что:

- для определения биологической активности лютеинизирующего гормона в препаратах гонадотропинов возможно использование крыс-самцов линии Sprague Dawley наряду с беспородными, указанными в методике Государственной фармакопеи Российской Федерации;
- чувствительность крыс линии Sprague Dawley выше, чем у беспородных, что подтвержда-

ется интегральным показателем, сочетающим оценку разброса и дозозависимости;

- благодаря более высокой чувствительности крыс линии Sprague Dawley возможно сокращение вдвое количества используемых особей в испытаниях для получения статистически достоверных результатов при определении биологической активности, что экономически выгодно и соответствует мировой тенденции сокращения количества лабораторных животных, используемых в исследованиях (концепция 3R).

Результаты исследования будут учтены при пересмотре общей фармакопейной статьи «Биологические испытания гонадотропинов» для следующего издания отечественной фармакопеи.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Рудакова ЕБ, Серова ОФ, Стрижова ТВ, Федорова ЕА, Острина СЯ. Роль лютеинизирующего гормона в овариальной стимуляции в программах экстракорпорального оплодотворения (обзор литературы). *Проблемы репродукции*. 2022;28(1):129–35.  
Rudakova EB, Serova OF, Strizhova TV, Fedorova EA, Ostriina SYa. The role of luteinizing hormone in ovarian stimulation of IVF programs (literature review). *Russian Journal of Human Reproduction*. 2022;28(1):129–35 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.17116/repro202228011129>
2. Орлова НА, Ковнир СВ, Ходак ЮА, Ползиков МА, Воробьев ИИ. Рекомбинантный лютеинизирующий гормон человека для лечения бесплодия: получение линий-продуцентов. *Акушерство, гинекология и репродукция*. 2017;11(3):33–42.  
Orlova NA, Kovnir SV, Khodak YuA, Polzikov MA, Vorobyov II. Recombinant human luteinizing hormone for the treatment of infertility: the generation of producer cell lines. *Obstetrics, Gynecology and Reproduction*. 2017;11(3):33–42 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.17749/2313-7347.2017.11.3.033-042>
3. Mullen MP, Cooke D, Crow M. Structural and functional roles of FSH and LH as glycoproteins regulating reproduction in mammalian species. In: Vizcarra J, ed. *Gonadotropin*. Chapter 8. InTech; 2013. P. 155–80.  
<https://doi.org/10.5772/48681>
4. Steelman SL, Pohley FM. Assay of the follicle-stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 1953;53(6):604–16.  
<https://doi.org/10.1210/endo-53-6-604>
5. Burn JH, Finney DJ, Goodwin LG. *Biological standardization*. London: Oxford University Press; 1952.
6. Урбах ВЮ. *Биометрические методы. Статистическая обработка опытных данных в биологии, сельском хозяйстве и медицине*. М.: Наука; 1964.  
Urbakh VYu. *Biometric methods. Statistical processing of experimental data in biology, agriculture and medicine*. Moscow: Nauka; 1964 (In Russ.).
7. Беленький МЛ. *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*. Л.: Медгиз; 1963.  
Belenkiy ML. *Elements of quantitative assessment of pharmacological effects*. Leningrad: Medgiz; 1963 (In Russ.).

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *Т.А. Батуашвили* – планирование исследования, выполнение эксперимента, проведение сравнительного анализа полученных результатов, сбор данных литературы; *Е.О. Чечетова* – выполнение эксперимента, анализ полученных данных, систематизация и оформление результатов исследования, редактирование текста рукописи; *П.В. Шадрин* – проведение вычислений, выполнение сравнительного анализа полученных результатов, работа с графическим материалом; *Н.П. Неугодова* – идея исследования, редактирование текста рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

**Соответствие принципам этики.** Проведение исследования было одобрено на заседании локального этического комитета ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (протокол заседания № 3 от 16.11.2023).

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Tamara A. Batuasvili* planned the study, conducted experiments, performed the comparative analysis of the results obtained, and collected literature data. *Ekaterina O. Chechetova* conducted experiments, analysed the data obtained, collated and formatted the study results, and edited the manuscript. *Pavel V. Shadrin* carried out calculations, performed the comparative analysis of the results obtained, and worked with the graphical material. *Natalia P. Neugodova* elaborated the main idea of the study, edited the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication.

**Ethics approval.** The study was approved at a meeting of the Local Ethics Committee of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Minutes of Meeting No. 3 dated 16.11.2023).

#### ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Батуашвили Тамара Ариеловна**, канд. биол. наук / **Tamara A. Batuasvili**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2656-8131>

**Чечетова Екатерина Олеговна** / **Ekaterina O. Chechetova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6728-594X>

**Шадрин Павел Валерьевич** / **Pavel V. Shadrin**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7143-8227>

**Неугодова Наталия Петровна**, канд. биол. наук / **Natalia P. Neugodova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>

Поступила 11.03.2024

После доработки 08.04.2024

Принята к публикации 10.04.2024

Received 11 March 2024

Revised 8 April 2024

Accepted 10 April 2024



О.В. Шредер   
Д.В. Горячев   
В.А. Меркулов 

## Основные принципы расчета необходимой численности участников клинических исследований. Часть 1. Общие подходы (обзор)

*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*

✉ Шредер Ольга Васильевна; [shredrov@expmed.ru](mailto:shredrov@expmed.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Корректное планирование клинического исследования (КИ) является гарантией получения валидных результатов оценки эффективности и безопасности медицинского применения лекарственных средств. В настоящее время отсутствуют четкие критерии выбора базовых элементов, лежащих в основе разработки клинического дизайна, и прежде всего исследовательских гипотез, способов определения ожидаемой величины терапевтического эффекта, уровня статистической значимости и мощности исследования, статистических моделей расчета размера выборки субъектов.

**ЦЕЛЬ.** Систематизация и гармонизация технических требований к планированию дизайна клинического исследования в части определения размера выборки.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** В работе представлены основные требования и методологические подходы к разработке дизайнов медицинских исследований, направленных на оценку эффективности и подтверждение безопасности лекарственных средств. Приведены базовые принципы расчета необходимого размера выборки для обеспечения необходимой мощности планируемого КИ, а также математические модели, описывающие нулевые и альтернативные гипотезы, используемые при разработке основных статистических дизайнов исследования эффективности и безопасности лекарственных препаратов. Показано, что общим требованием к качеству выборки субъектов исследования является обеспечение ее репрезентативности, то есть соответствие целевой популяции КИ. Выбор математической (вероятностной) модели, на основе которой формулируются исследовательские гипотезы и производится расчет выборки целевой популяции, базируется прежде всего на базовой информации о терапевтическом воздействии и специфических особенностях популяции, полученной из систематических обзоров результатов ранее проведенных исследований, а также в соответствии с классификацией исследуемого препарата. Для расчета размера выборки должны быть определены и обоснованы на этапе разработки дизайна и статистической модели КИ критерии в соответствии с общими требованиями к репрезентативности. Использование программных приложений для расчета мощности и требуемого размера выборки упрощает выполнение рутинных процедур планирования клинических исследований.

**ВЫВОДЫ.** Основных и базовых статистических моделей определения размера выборки недостаточно для проведения качественного исследования. Большое разнообразие дизайнов КИ, методологических подходов к планированию, реализации схем лечения, сбора и анализа данных КИ требует разработки статистических планов каждого конкретного КИ, включая оценку отдельных случаев, метода анализа выживания, относительного риска, диагностические тесты, адаптивные и другие нечасто используемые планы исследования. Следствием этого является востребованность в разработке дополнительных руководств и других информационных ресурсов, содержащих комментарии и примеры применения вероятностной статистики, и последующей гармонизации созданных национальных стандартов с международными.

**Ключевые слова:** клиническое исследование; выборка; популяция; размер выборки; дизайн исследования; гипотеза исследования; размер эффекта; статистическая модель

**Для цитирования:** Шредер О.В., Горячев Д.В., Меркулов В.А. Основные принципы расчета необходимой численности участников клинических исследований. Часть 1. Общие подходы (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):338–350. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-338-350>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022300127-0).

**Потенциальный конфликт интересов.** Д.В. Горячев – член редакционной коллегии журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» с 2018 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Olga V. Shreder   
Dmitry V. Goryachev   
Vadim A. Merkulov 

## Basic Principles for Calculating the Required Number of Participants in Clinical Trials. Part 1. Common Approaches (Review)

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

✉ **Olga V. Shreder;** [shrederov@expmed.ru](mailto:shrederov@expmed.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** A well-planned design of a clinical trial (CT) ensures valid results in assessing the efficacy and safety of medicines for human use. However, at present, there are no clear criteria for selecting the basic elements underlying the development of a CT design. This lack of selection criteria primarily concerns planning research hypotheses, calculating the expected therapeutic effect, statistical significance level, and study power, and selecting statistical models for sample size calculation.

**AIM.** The authors aimed to systematise and harmonise the technical requirements for sample size determination in designing CTs.

**DISCUSSION.** First, this article describes the basic requirements for and methodological approaches to designing CTs to assess the efficacy of medicines and to confirm their safety. Next, the article presents the basic principles for calculating the sample size to ensure the required CT power. Finally, the article covers the mathematical models describing the null and alternative hypotheses used in the development of basic statistical designs for efficacy and safety studies. A general requirement for the quality of a study sample is to ensure its representativeness, that is, its compliance with the target CT population. The selection of a mathematical (probabilistic) model to formulate research hypotheses and calculate study samples representative of the target population is based on general data from systematic reviews of previous studies on the therapeutic effects of the study product and the specific characteristics of the target population. In addition, model selection relies on the classification of the study product. Sample size calculation requires defining and justifying certain criteria at the stage of CT design and statistical model development, in line with the general requirements for representativeness. Software for calculating the statistical power and required sample size facilitates routine CT planning.

**CONCLUSIONS.** The sample size determination requires more than the application of basic statistical models. Given the multitude of CT designs and methodological approaches to CT planning, treatment regimens, and data collection and analysis, it is necessary to consider the statistical design of each CT on a case-by-case basis. This consideration should include assessments of individual cases, survival analysis methods, relative risks, diagnostic tests, and adaptive and other infrequent CT designs. The above highlights the need to develop additional guidelines and information resources that would explain and demonstrate the use of probabilistic statistics. The resulting national standards should be harmonised with international standards.

**Keywords:** clinical trial; study sample; population; sample size; study design; study hypothesis; effect size; statistical model

**For citation:** Shreder O.V., Goryachev D.V., Merkulov V.A. Basic principles for calculating the required number of participants in clinical trials. Part 1. Common approaches (review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):338–350. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-338-350>

**Funding.** The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00026-24-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 124022300127-0).

**Disclosure.** Dmitry V. Goryachev has been a member of the Editorial Board of *Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2018. The other authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Расчет размера выборки является неотъемлемой частью разработки дизайна большинства клинических исследований (КИ), обеспечивающей валидность, точность и надежность результатов КИ [1–4]. Исключением являются некоторые пилотные исследования, предназначенные для подтверждения целесообразности и возможности проведения более масштабного КИ, определения первичной информации, дающей необходимые представления об основных характеристиках популяции, а также методах сбора данных и расчета размера выборки участников КИ [1–3].

Необходимость научного обоснования размера выборки может быть продемонстрирована на следующих примерах [1, 2, 4]:

- если размер выборки в исследовании с отрицательными результатами достаточен для выявления клинически значимого эффекта, то отрицательные результаты КИ поддаются интерпретации;
- если исследование не продемонстрировало клинически значимый эффект лечения, то эти результаты не могут использоваться для расчета выборки при планировании нового исследования;
- если размер выборки в исследовании с отрицательными результатами недостаточен, то клинически важный (но статистически незначимый) эффект может быть проигнорирован и исследуемое лечение может интерпретироваться как неэффективное (бесполезное).

Проведение КИ должно быть экономически целесообразно, это достигается, в частности, корректным планированием размера выборки [3, 4]:

- исследование, проведенное на выборке небольшого размера, может не привести к обнаружению эффекта и повлечь неоправданные экономические потери, поскольку без достаточного размера выборки собранных данных может быть упущен (не выявлен) клинически значимый эффект, различие между группами или некая взаимосвязь, например, между

дозовыми режимами препарата и показателями излечения пациентов;

- исследование, проведенное на выборке чрезмерно большого размера, может привести к значительным экономическим затратам и при этом дать статистически значимые результаты, которые могут не иметь большого клинического или практического значения. Следует учитывать, что, если исследование основано на очень большой выборке, оно почти всегда приведет к статистически значимым результатам.

При проведении КИ важно придерживаться соблюдения этических принципов [3, 4]:

- исследование, планируемое на выборке небольшого размера, может подвергнуть участников бесполезному, иногда потенциально вредному терапевтическому воздействию без возможности получить клинически важные результаты;
- исследование, планируемое на выборке чрезмерно большого размера, может неоправданно подвергнуть большое число испытуемых потенциально вредному или бесполезному терапевтическому воздействию.

Таким образом, очевидна необходимость сочетания научной, экономической и этической составляющих в программе разработки эффективных и безопасных лекарственных средств (ЛС).

Цель работы – систематизация и гармонизация технических требований к планированию дизайна клинического исследования в части определения размера выборки.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### Общие требования, этапы и критерии для расчета выборки

Концепция определения размера выборки и оценки статистической мощности является основой планирования КИ и гарантией получения надежных выводов о клиническом эффекте ЛС. Ключевым инструментом в процессе

планирования и принятия решения о пользе и риске медицинского применения ЛС являются методы доказательной медицины, в частности вероятностной статистики, применяемые в программах клинической разработки в соответствии с требованиями отечественных и зарубежных нормативных актов<sup>1</sup>.

Статистическая сущность этого принципа заключается в проверке исследовательских гипотез путем статистического анализа клинических данных [1–12]. Нулевая гипотеза ( $H_0$ ) в большинстве случаев формулируется в предположении об отсутствии различий между сравниваемыми группами терапии в эффективности медицинского вмешательства и утверждает случайный характер их обнаружения. Подтверждением того, что наблюдаемое различие между группами неслучайно и может рассматриваться как весомый аргумент для отклонения нулевой гипотезы в пользу альтернативной гипотезы ( $H_1$ ), является установление величины разницы, обоснованной при планировании исследования как «величина клинически значимого эффекта». Следует учитывать, что результат определения только статистической значимости различий между группами сравнения без подтверждения наличия искомой величины разницы, обоснованной на этапе планирования как «клинически значимый эффект», не является корректным представлением доказательства альтернативной гипотезы клинического исследования.

Одним из критериев отклонения  $H_0$  является значение уровня статистической значимости, которое в зависимости от выбранного дизайна КИ устанавливается на уровне 0,05 при двустороннем и 0,025 при одностороннем тестировании [2, 4, 5]. Процесс отклонения нулевой гипотезы сопряжен с потенциальными ошибками I и II рода [1–34]:

- риск ошибки I рода ( $\alpha$ ) связан с вероятностью неправильного отклонения  $H_0$ , то есть ассоциируется с ложноположительным результатом принятия  $H_1$ ;
- риск ошибки II рода ( $\beta$ ) связан с вероятностью неправильного отклонения  $H_1$ , то есть ассоциируется с ложноотрицательным результатом принятия  $H_0$ .

Для исключения таких ошибок в зависимости от условий тестирования статистической

модели клинического исследования определяют значения  $\alpha$ - и  $\beta$ -ошибок. Риск ошибки I рода ( $\alpha$ ) обычно устанавливается равным  $p=0,05$  или  $p=0,025$ , а риск ошибки II рода ( $\beta$ ) – 10–20%. Поскольку заданное значение разницы или эффекта может быть и выше, и ниже нуля (гипотеза  $H_0$ ), риск ошибки  $\beta$  всегда односторонний. Чем меньше риск ошибки  $\beta$ , тем больше статистическая мощность ( $P=1-\beta$ ) – вероятность обнаружения разницы между группами терапии, если она действительно существует, и верного принятия гипотезы  $H_1$ . Статистическая мощность обычно устанавливается на уровне не ниже 80% при допущении 20%-ной вероятности ошибочного принятия нулевой гипотезы ( $\beta=0,20$ ) [2–6].

Общим требованием к качеству выборки субъектов исследования является обеспечение ее репрезентативности, то есть соответствие целевой популяции КИ [2–17].

Выбор математической (вероятностной) модели, на основе которой формулируются исследовательские гипотезы и производится расчет выборки целевой популяции, базируется прежде всего на базовой информации о терапевтическом воздействии, специфических особенностях популяции (демографические характеристики, состояние здоровья, особенности течения заболевания, симптоматические характеристики и т.д.), полученной из систематических обзоров, результатов ранее проведенных исследований, а также классификации исследуемого ЛП (референтный, оригинальный, воспроизведенный, биоаналоговый). Другими факторами, влияющими на определение модели, являются фаза, дизайн, цели, задачи КИ, конечные точки эффективности и безопасности, методы статистической оценки. Выбор статистической модели в большинстве случаев осуществляется из перечня базовых формул (табл. 1 «Классификация и дизайны клинических исследований», опубликована на сайте журнала<sup>2</sup>, табл. 2).

Требование надежности имеет отношение к ожидаемым результатам планируемого КИ в целом и формированию выборки на основе предварительно полученных данных из пилотных исследований или литературных сведений в частности и включает:

- возможность повторения эксперимента с получением сходных результатов;

<sup>1</sup> Рекомендации Коллегии ЕЭК от 03.11.2020 № 19 «О Руководстве по применению принципов биостатистики в клинических исследованиях лекарственных препаратов».

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

ICH Harmonised tripartite guideline. Statistical principles for clinical trials E9, 1998.

ICH Harmonised tripartite guideline. Structure and content of clinical study reports E3, 1995.

<sup>2</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-338-350-tabl1>

Таблица 2. Правила определения размера выборки для сравнения средних значений и пропорций (по L. Thabane [2] с изменениями)

Table 2. Guidelines for sample size determination for comparisons between means and proportions (adapted from L. Thabane [2])

Дизайн Design	Гипотеза Hypothesis	Формулы для сравнения средних Formulae for comparisons between means			Формулы для сравнения пропорций Formulae for comparisons between proportions		
		H <sub>0</sub>	H <sub>1</sub>	Формулы Formulae	H <sub>0</sub>	H <sub>1</sub>	Формулы Formulae
Одновыборочный One-sample	Неравенство средних (пропорций) Equality of means (proportions)	$\mu - \mu_0 = 0$	$\mu - \mu_0 \neq 0$	$n = \frac{(z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \sigma^2}{(\mu - \mu_0)^2}$	$\pi - \pi_0 = 0$	$\pi - \pi_0 \neq 0$	$n = \frac{(z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \pi(1 - \pi)}{(\pi - \pi_0)^2}$
	Превосходство Superiority	$\mu - \mu_0 \leq \delta$	$\mu - \mu_0 > \delta$	$n = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \sigma^2}{(\mu - \mu_0 - \delta)^2}$	$\pi - \pi_0 \leq \delta$	$\pi - \pi_0 > \delta$	$n = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \pi(1 - \pi)}{(\pi - \pi_0 - \delta)^2}$
	Эквивалентность Equivalence	$ \mu - \mu_0  \geq \delta$	$ \mu - \mu_0  < \delta$	$n = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \sigma^2}{( \mu - \mu_0  - \delta)^2}$	$ \pi - \pi_0  \geq \delta$	$ \pi - \pi_0  < \delta$	$n = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \pi(1 - \pi)}{(\pi - \pi_0 - \delta)^2}$
Параллельный с двумя выборками Two-sample parallel	Неравенство средних (пропорций) Equality of means (proportions)	$\mu_1 - \mu_2 = 0$	$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	$n_i = \frac{2(z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$	$\pi_1 - \pi_2 = 0$	$\pi_1 - \pi_2 \neq 0$	$n_i = \frac{(z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 (\pi_1(1 - \pi_2) + \pi_2(1 - \pi_1))}{(\pi_1 - \pi_2)^2}$
	Не меньшей эффективности Non-inferiority	$\mu_1 - \mu_2 \geq \delta$	$\mu_1 - \mu_2 < \delta$	$n_i = \frac{2(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2 - \delta)^2}$	$\pi_1 - \pi_2 \geq \delta$	$\pi_1 - \pi_2 < \delta$	$n_i = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 (\pi_1(1 - \pi_2) + \pi_2(1 - \pi_1))}{(\pi_1 - \pi_2 - \delta)^2}$
	Превосходство Superiority	$\mu_1 - \mu_2 \leq \delta$	$\mu_1 - \mu_2 > \delta$	$n_i = \frac{2(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2 - \delta)^2}$	$\pi_1 - \pi_2 \leq \delta$	$\pi_1 - \pi_2 > \delta$	$n_i = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 (\pi_1(1 - \pi_2) + \pi_2(1 - \pi_1))}{(\pi_1 - \pi_2 - \delta)^2}$
	Эквивалентность Equivalence	$ \mu_1 - \mu_2  \geq \delta$	$ \mu_1 - \mu_2  < \delta$	$n_i = \frac{2(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \sigma^2}{( \mu_1 - \mu_2  - \delta)^2}$	$ \pi_1 - \pi_2  \geq \delta$	$ \pi_1 - \pi_2  < \delta$	$n_i = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 (\pi_1(1 - \pi_2) + \pi_2(1 - \pi_1))}{( \pi_1 - \pi_2  - \delta)^2}$
Перекрестный с двумя выборками Two-sample crossover	Неравенство средних (пропорций) Equality of means (proportions)	$\mu_1 - \mu_2 = 0$	$\mu_1 - \mu_2 \neq 0$	$n_i = \frac{(z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \sigma_d^2}{2(\mu_1 - \mu_2)^2}$	$\pi_1 - \pi_2 = 0$	$\pi_1 - \pi_2 \neq 0$	$n_i = \frac{(z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \sigma_d^2}{2(\pi_1 - \pi_2)^2}$
	Не меньшей эффективности Non-inferiority	$\mu_1 - \mu_2 \geq \delta$	$\mu_1 - \mu_2 < \delta$	$n_i = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \sigma_d^2}{2(\mu_1 - \mu_2 - \delta)^2}$	$\pi_1 - \pi_2 \geq \delta$	$\pi_1 - \pi_2 < \delta$	$n_i = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \sigma_d^2}{2(\pi_1 - \pi_2 - \delta)^2}$
	Превосходство Superiority	$\mu_1 - \mu_2 \leq \delta$	$\mu_1 - \mu_2 > \delta$	$n_i = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \sigma_d^2}{2(\mu_1 - \mu_2 - \delta)^2}$	$\pi_1 - \pi_2 \leq \delta$	$\pi_1 - \pi_2 > \delta$	$n_i = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \sigma_d^2}{2(\pi_1 - \pi_2 - \delta)^2}$
	Эквивалентность Equivalence	$ \mu_1 - \mu_2  \geq \delta$	$ \mu_1 - \mu_2  < \delta$	$n_i = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \sigma_d^2}{2( \mu_1 - \mu_2  - \delta)^2}$	$ \pi_1 - \pi_2  \geq \delta$	$ \pi_1 - \pi_2  < \delta$	$n_i = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \sigma_d^2}{2( \pi_1 - \pi_2  - \delta)^2}$

Таблица адаптирована авторами из [2] / The table is adapted by the authors from [2]

**Примечание.** H<sub>0</sub> – нулевая гипотеза; H<sub>1</sub> – альтернативная гипотеза; n – размер выборки; σ – стандартное отклонение; δ – величина разницы (μ – μ<sub>0</sub>) или (μ<sub>1</sub> – μ<sub>2</sub>) или (π<sub>1</sub> – π<sub>2</sub>), минимальная клинически значимая разница; μ – среднее значение распределения переменной отклика (ответа на лечение); μ<sub>0</sub> – исходное (базовое) среднее значение; μ<sub>1</sub> – среднее значение нового лечения; μ<sub>2</sub> – среднее значение стандартного лечения; (μ<sub>1</sub> – μ<sub>2</sub>) – величина разницы, имеющей клиническое значение; π<sub>1</sub> – первая доля (значение нового лечения); π<sub>2</sub> – вторая доля (значение стандартного лечения); (π<sub>1</sub> – π<sub>2</sub>) – величина разницы, имеющей клиническое значение; σ<sub>d</sub> – стандартное отклонение распределения d (где d – изменение по сравнению с исходным уровнем); z<sub>α</sub> – величина для подстановки в формулу расчета выборки – зависит от выбора желаемого уровня значимости (см. табл. 3).

**Note.** H<sub>0</sub>, null hypothesis; H<sub>1</sub>, alternative hypothesis; n, sample size; σ, standard deviation; δ, size of difference of clinical importance between (μ – μ<sub>0</sub>), (μ<sub>1</sub> – μ<sub>2</sub>), or (π<sub>1</sub> – π<sub>2</sub>) (minimum clinically meaningful difference); μ, mean value of the distribution of the response variable (response to treatment); μ<sub>0</sub>, corresponding baseline mean value; μ<sub>1</sub>, mean value of the new treatment; μ<sub>2</sub>, mean value of the standard treatment; (μ<sub>1</sub> – μ<sub>2</sub>), size of difference of clinical importance; π<sub>1</sub>, first proportion (value of the new treatment); π<sub>2</sub>, second proportion (value of the standard treatment); (π<sub>1</sub> – π<sub>2</sub>), size of difference of clinical importance; σ<sub>d</sub>, standard deviation of the distribution of d (where d is the change from baseline); z<sub>α</sub>, value to be substituted into the sample size calculation formula, depending on the desired significance level (see Table 3).

- уровень доверия к ожидаемым или полученным результатам;
- данные о точности («уровне статистической значимости»), с которой были получены результаты исследования.

Перечень критериев, необходимых для расчета репрезентативной выборки [1–6]:

- показатель вариабельности основного показателя исследования в числовой шкале измерений. Таким показателем, как правило, является стандартное отклонение, если не обоснована другая статистическая характеристика вариабельности;
- размер эффекта, или «наименьший клинически значимый эффект». Обычно выражается как разность средних значений основного показателя эффекта или разность величин долей ответа на терапию (%). Реже вместо разности используется отношение данных показателей. При отсутствии результатов предыдущих исследований или данных литературы размер ожидаемого эффекта может выражаться в значениях стандартного отклонения в виде стандартизованной разности интересующего показателя;
- уровень статистической значимости ( $\alpha$ ) – пороговое значение 0,05 при двустороннем и 0,025 при одностороннем тестировании гипотезы. Ниже указанного значения отклоняют  $H_0$  и принимают  $H_1$  при условии подтверждения наличия разницы между группами, соответствующей пороговой величине «превосходства», «эквивалентности» или «не меньшей эффективности», обоснованной при планировании соответствующего дизайна КИ;
- статистическая мощность ( $P=1-\beta$ ) – вероятность обнаружения разницы между группами терапии, если она действительно существует. При допущении 20%-ной вероятности ошибки ( $\beta=0,20$ ) мощность устанавливается не менее 80% ( $P \geq 0,80$ ) [2–6].

Вышеуказанные критерии должны быть определены и обоснованы на этапе разработки дизайна и статистической модели КИ (табл. 1 «Классификация и дизайны клинических исследований», опубликована на сайте журнала<sup>3</sup>, табл. 2) [1, 2, 10–18, 20–32].

Таким образом, критериями определения репрезентативной выборки для КИ являются [2, 4, 5]:

- изменчивость основного параметра оценивания (чем разнообразней показания, заявляемые для регистрации, тем больше наблюдений (участников) нужно включить в КИ);

- клинически важный размер эффекта (чем меньше величина эффекта основного критерия оценивания, тем больше наблюдений (участников) необходимо);
- условия тестирования  $H_0$  и  $H_1$  – определяются целями и задачами планируемого КИ;
- статистическая мощность теста (уровень вероятности, при которой следует отвергнуть  $H_0$ ).

Изменчивость основного параметра оценивания в большинстве случаев характеризуется величиной стандартного отклонения, определенной на основании данных литературы, систематических обзоров на основе метаанализа (Кокрейновские обзоры) или собственных пилотных исследований, включающих результаты сравнения группирующих средних значений основных показателей эффективности терапии [2, 4, 6, 17]. При определении величины изменчивости основного параметра оценивания из данных источников литературы необходимо учитывать, что большое значение стандартного отклонения указывает на недостаточную значимость эффекта и приведет к формированию выборки большого размера.

Определение наименьшего размера клинически значимого эффекта должно быть основано на данных систематизированных источников, результатов аналогичных клинических исследований, Кокрейновских обзоров, экспертных заключений и клинических рекомендаций или данных собственных пилотных исследований, включающих статистически значимые результаты оценки основных показателей сравнительной фармакотерапии. В случае отсутствия информации о наименьшей клинически важной величине в подходящей для расчета выборки метрической шкале или для обоснования таковой для изучения нового оригинального ЛС могут потребоваться дополнительные перерасчеты опубликованных сходных результатов из доступных источников литературы и приведение их в подходящий формат с последующим обоснованием применимости для определения размера выборки участников планируемого дизайна или пилотного КИ [2, 4, 6–8, 17].

Еще одним способом определения клинически значимого размера эффекта, например при планировании исследования нового оригинального ЛС или при отсутствии какой бы то ни было информации, является его оценка на основе известных стандартизованных значений, названных J. Cohen «малый», «средний» и «большой» размеры эффекта [4, 8, 9]:

<sup>3</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-338-350-tabl1>

- при тестировании разницы между двумя средними размерами эффекта ( $d$ )<sup>4</sup> составляют: малый – 0,20; средний – 0,50; большой – 0,80;
- при тестировании разницы между несколькими средними размерами эффекта ( $f$ )<sup>5</sup> составляют: малый – 0,10; средний – 0,25; большой – 0,40;
- при тестировании разницы между долями с использованием критерия  $\chi$ -квадрат и коэффициента корреляции Пирсона размеры эффекта ( $\omega$  или  $r$ )<sup>6</sup> составляют: малый – 0,10; средний – 0,30; большой – 0,50.

Следует учитывать, что размер эффекта зависит от дизайна КИ и критериев оценивания основного показателя, поэтому необходимо обосновать выбор объективной величины эффекта в соответствии со шкалой измерения, используемой для тестирования исследовательских гипотез.

### Условия тестирования нулевой и альтернативной гипотезы

Существуют два варианта тестирования нулевой ( $H_0$ ) и альтернативной ( $H_1$ ) гипотез (табл. 3, рис. 1) [2, 9, 17, 18]. В случае когда ожидается разница в одном направлении (правостороннее или левостороннее тестирование), используется одностороннее тестирование. Двустороннее тестирование подходит, когда ожидается разница в любом направлении [2, 17, 18]. Если критическое значение задается величиной  $\delta$ , то характер распределения и положение критической области для  $H_0$  и  $H_1$  выглядят следующим образом:

$\mu \leq \delta$   $\mu > \delta$ : критическая область справа – одностороннее тестирование;

$\mu \geq \delta$   $\mu < \delta$ : критическая область слева – одностороннее тестирование;

$\mu = \delta$   $\mu = \delta$ : две критические области – двустороннее тестирование.

При одностороннем тестировании исследовательской гипотезы требуется выборка меньших размеров, чем при двустороннем. Однако

возможность использования односторонних тестов для расчета должна быть обоснована, не допускается использовать такой тип тестирования только в целях уменьшения размера выборки [12].

Одностороннее направление тестирования не является достаточным основанием, чтобы использовать односторонний критерий для расчета численности субъектов исследования. Такой тип тестирования целесообразно использовать при планировании плацебо-контролируемых исследований или при сравнении комбинированной схемы лечения и монотерапии в КИ с дизайном превосходства [10, 11]. Если нет объективных причин для использования одностороннего тестирования, следует пользоваться двусторонней гипотезой.

При планировании дизайнов «не меньшей эффективности» и «эквивалентности» терапии двустороннее тестирование предполагает, что  $H_0$  заключается в отсутствии различий, а  $H_1$  предполагает, что различия между группами могут проявляться в любом направлении.

**Определение уровня ошибки I рода.** Альфа ( $\alpha$ )-ошибка I рода – это ошибочное заключение о существовании различий, которых в действительности нет. За вероятность ошибки I рода принимается  $p$ -значение 0,05 или 0,025 в зависимости от дизайна КИ и условия тестирования гипотез (одно- или двустороннее тестирование). Нулевая гипотеза отклоняется в случаях, если величина  $p$  меньше 0,05 или 0,025. Величина  $p$ , определяемая как уровень значимости, является тем значением, ниже которого  $H_0$  отклоняется и принимается  $H_1$  о наличии доказательств эффекта. В большинстве случаев двустороннего тестирования уровень статистической значимости выбирается равным  $\alpha=0,05$ , или 5%, а при одностороннем тестировании  $\alpha=0,025$ , или 2,5%. Выбор большей величины альфа ( $\alpha=0,05$ ) приводит к уменьшению размера численности субъектов для исследования.

<sup>4</sup>  $d$  – стандартизованная средняя разница между двумя выборками, деленная на объединенное стандартное отклонение;  $(\mu_1 - \mu_2) / \sigma$ , где  $\mu_1$  и  $\mu_2$  – средние значения эффекта,  $\sigma$  – объединенная оценка дисперсии ( $s$ ) выборок 1 и 2 соответственно  $= \sqrt{(s_1^2 + s_2^2) / 2}$ .

<sup>5</sup>  $f^2$  – стандартизованная средняя разница между несколькими выборками при использовании F-теста для ANOVA или множественной регрессии;

$f^2$  для множественной регрессии:  $f^2 = R^2 / (1 - R^2)$ , где  $R^2$  – квадрат множественной корреляции;

$f^2$  для дисперсионного анализа (ANOVA) в сбалансированном дизайне с одинаковыми размерами выборок по группам:  $f^2 = SS(\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_k) / (K \cdot \sigma^2)$ , где  $\mu_j$  ( $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_k$ ) – средние значения эффекта выборки в  $j$ -й группе из общего числа  $K$  групп,  $\sigma$  – объединенная оценка стандартных отклонений в каждой группе,  $SS$  – сумма квадратов в ANOVA.

<sup>6</sup>  $r$  – коэффициент корреляции Пирсона, определяется как размер эффекта парных количественных данных при использовании анализа взаимосвязи между двумя переменными: диапазон величин от -1 до 1, где, 0 – отсутствие линейной связи, -1 – отрицательная линейная связь, 1 – положительная линейная связь между двумя переменными;

$r^2$  – коэффициент детерминации, определяется как квадрат корреляции Пирсона парных данных и используется для оценки доли дисперсии между двумя переменными: диапазон величин от 0 до 1, где  $r^2$  имеет положительное значение;

$\omega$  – размер эффекта категориальных данных при использовании теста  $\chi$ -квадрат:  $\omega = \sqrt{m \sum_{i=1}^m (p_{1i} - p_{0i})^2 / p_{0i}}$ , где  $p_{0i}$  – доля  $i$ -й группы для  $H_0$ ,  $p_{1i}$  – доля  $i$ -й группы для  $H_1$ ,  $m$  – количество групп.

**Таблица 3.** Таблица значений критериев, необходимых для расчета выборки в зависимости от условия тестирования гипотезы [1–6, 18]**Table 3.** Tabulated test statistics required for sample size calculation based on the hypothesis testing conditions [1–6, 18]

Условие тестирования гипотезы <i>Hypothesis testing condition</i>	Доверительный интервал <i>Confidence interval</i>	Ошибка I рода (α), % <i>Type I error (α), %</i>	Ошибка II рода (β), % <i>Type II error (β), %</i>	α	$z_{\alpha}$ и $z_{\alpha/2}$ (для одно- и двустороннего тестирования соответственно) $z_{\alpha}$ and $z_{\alpha/2}$ (for one- and two-sided tests, respectively)	β	$Z_{\beta}$	Мощность теста (P=1-β), % <i>Test power (P=1-β), %</i>	Уровень статистической значимости, p <i>Statistical significance, p</i>
Двусторонний критерий <i>Two-sided test</i>	90	10	20	0,1	1,64	0,2	0,84	80	<0,1
	95	5	20	0,05	1,96	0,2	0,84	80	<0,05
	99	1	20	0,01	2,58	0,2	0,84	80	<0,01
Односторонний критерий <i>One-sided test</i>	95	5	20	0,1	1,64	0,2	0,84	80	<0,1
	97,5	2,5	20	0,025	1,96	0,2	0,84	80	<0,025
	99,5	0,5	20	0,005	2,58	0,2	0,84	80	<0,005

Таблица составлена авторами по данным литературы / The table is prepared by the authors on the basis of published data

**Примечание.** Примеры применения критериев, необходимых для расчета выборки, в концепции интервального оценивания.

А) Односторонний тест концентрирует 5% область отклонения гипотезы в одном хвосте нормального распределения (z-оценка 1,64 или выше). При двустороннем тестировании в случае такого же доверительного интервала z-оценка составит ±1,96, так как 5% составляют 2,5% в каждом из двух хвостов стандартного распределения (рис. 1).

Б)  $z_{\alpha/2}$  для тестирования, уровень доверия<sup>7</sup> которого соответствует 90%, определяется следующим образом: уровень значимости  $\alpha/2$  составит 1–0,9=0,1,  $\alpha/2=0,1/2=0,05$ . Критическое значение z определяется по таблице критических значений z [4], для абсолютной величины  $\alpha/2=0,05$  составит 1,64 (при одностороннем тестировании гипотезы  $z_{0,1/2}=1,64$ ). При условии выбора уровня доверия 95%  $\alpha$  составит 1–0,95=0,05, то есть  $\alpha/2=0,05/2=0,025$  и соответствующее критическое значение z, для абсолютной величины  $\alpha/2=1,96$  (при одностороннем тестировании гипотезы  $z_{0,05/2}=1,96$ ).

В) При условии выбора уровня доверия 99%  $\alpha$  составит 1–0,99=0,01, то есть  $\alpha/2=0,01/2=0,005$ , соответствующее критическое значение z для абсолютной величины  $\alpha/2=2,58$  (при одностороннем тестировании гипотезы  $z_{0,01/2}=2,58$ ).

**Note.** Examples of applying the tests required for sample size calculation based on confidence interval estimation.

А) A one-sided test concentrates the 5% rejection region in one tail of a normal distribution (z-score of 1.64 or greater). A two-sided test for the same confidence interval would result in a z-score of ±1.96 because the 5% rejection region is comprised of 2.5% regions in each of the two tails (Fig. 1).

Б)  $z_{\alpha/2}$  is determined as follows: For a test that is using a 90% confidence level, the significance level  $\alpha$  would be 1–0.9=0.1, and  $\alpha/2=0.1/2=0.05$ . The corresponding critical value of z is determined using a table of critical values of z [4]. The critical value of z corresponding to the absolute value of  $\alpha/2=0.05$  would be 1.64 (for one-sided hypothesis testing  $z_{0,1/2}=1.64$ ). For a test that is using a 95% confidence level, the significance level  $\alpha$  would be 1–0.95=0.05, that is,  $\alpha/2=0.05/2=0.025$ . The critical value of z corresponding to this absolute value of  $\alpha/2$  would be 1.96 (for one-sided hypothesis testing  $z_{0,05/2}=1.96$ ).

С) For a test that is using a 99% confidence level, the significance level  $\alpha$  would be 1–0.99=0.01, that is,  $\alpha/2=0.01/2=0.005$ , and the critical value of z corresponding to this absolute value of  $\alpha/2$  would be 2.58 (for one-sided hypothesis testing  $z_{0,01/2}=2.58$ ).

Статистическая мощность исследования — критерий корректного отклонения  $H_0$  в случаях подтверждения различия между группами сравнения. Этот критерий рассчитывается по формуле  $P=1-\beta$  (или  $100-\beta$  (%)), где вероятность ошибки II рода  $\beta$  устанавливается равной не более 20% (соответственно, величина статистической мощности должна быть не ниже 80%). При корректном учете статистической мощности вероятность случайной ошибки в установлении истинной клинически значимой разницы

в эффектах снижается и увеличивается вероятность получения статистически значимого результата исследования.

Размер выборки участников КИ может рассчитываться несколькими способами, при этом во всех случаях применяется одинаковый подход к выбору базовых элементов расчета [3–5, 8, 12–15]:

- общий набор формул для расчета размера выборки участников в разных дизайнах КИ [16, 17];

<sup>7</sup> Уровень доверия  $\beta=1-\alpha$  — это вероятность попадания значения тестовой статистики в доверительный интервал, который с заданной вероятностью покрывает оцениваемый показатель исследования. Уровни доверия 0,99; 0,95; 0,9 соответствуют уровням значимости 0,01; 0,05; 0,1; уровни значимости и доверия могут быть представлены в процентах и десятичных значениях.

<sup>8</sup> Уровень значимости  $\alpha$  — заданный уровень статистической значимости — «пороговое значение», относительно которого определяется вероятность (p-значение) непопадания в доверительный интервал значений, если значение тестовой статистики больше или меньше z-показателя альфа-уровня (или p-значение больше или меньше альфа-значения) в зависимости от условий тестирования гипотез исследования.

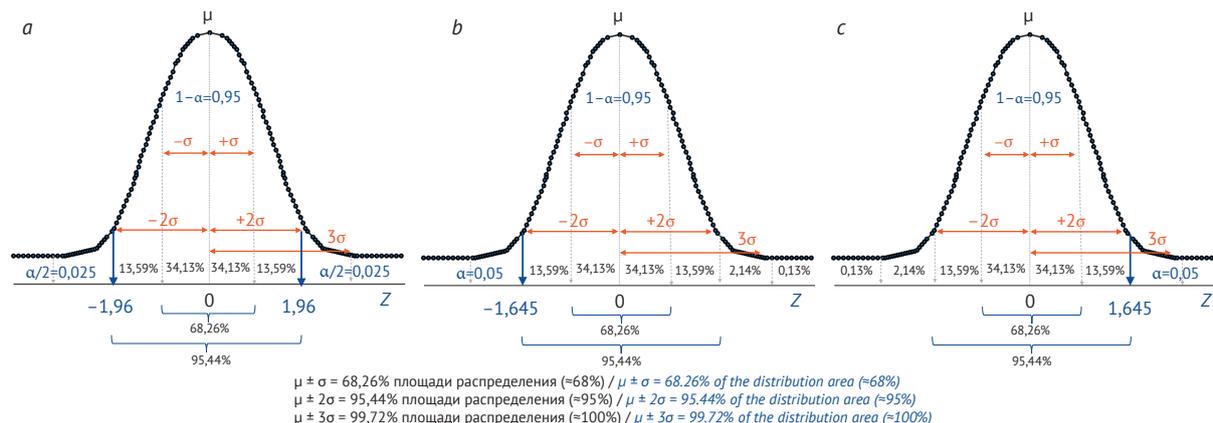


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

**Рис. 1.** Условия тестирования гипотезы: а – двустороннее тестирование; б – левостороннее тестирование; с – правостороннее тестирование

**Fig. 1.** Hypothesis testing conditions: a, two-sided testing; b, left-sided testing; c, right-sided testing

- возможность использования «быстрых формул»<sup>9</sup> для расчета размера выборки участников при соблюдении требований по выбору уровня значимости, статистической мощности исследования и расчету стандартизированной разницы [13, 14];
- возможность использования общедоступных таблиц, содержащих стандартизированные значения для расчета размера выборки и проверки исследовательских гипотез, на основе работ J. Cohen [8] или сводных данных об ожидаемых размерах эффекта при использовании непарного *t*-критерия или критерия  $\chi^2$ -квадрат Пирсона [16, 17];
- использование общедоступной диаграммы «номограмма Альтмана», устанавливающей связь выборки, мощности статистического критерия, уровня значимости и стандартизированной разности, которая применима для различных статистических дизайнов КИ [3, 11].

### Методологические подходы к разработке дизайна клинических исследований

Основные этапы определения необходимой численности участников клинических исследований включают [2–6]: 1) выбор дизайна, соответствующего фазе, цели и задачам КИ; 2) выбор гипотезы и метода расчета или обоснования размера выборки в соответствии с целью КИ, данными литературы и регистрационным статусом действующего вещества исследуемого ЛС; 3) обоснование достаточности размера выборки путем аргументации ожидаемой пороговой

величины различий в эффектах, выбора оценочных критериев, данных об экономической целесообразности (если применимо), особенностях популяции исследования и др.; 4) корректировку размера выборки в случаях проведения промежуточного анализа или в соответствии с правилами адаптивных дизайнов, предусматривающих увеличение размера выборки по результатам промежуточной оценки или учет выбывших из исследования субъектов.

Проведение рандомизированных клинических исследований является основным требованием при регистрации ЛС [15, 16, 18]. В практике проведения КИ наибольшее распространение получили три статистических дизайна (табл. 1 «Классификация и дизайны клинических исследований», опубликована на сайте журнала<sup>10</sup>, табл. 2): превосходства, не меньшей эффективности, эквивалентности, которые включают [12, 18–33]:

- неконтролируемые планы – дизайны, которые часто выбирают при проведении КИ I и II фаз и пострегистрационных исследований IV фазы;
- контролируемые планы – дизайны, которые часто выбирают при проведении КИ III фазы, в частности рандомизированные схемы параллельного и перекрестного группового анализа.

**Исследование превосходства.** Целью исследования является доказательство преимущества в терапевтическом эффекте сравниваемых групп лечения.

<sup>9</sup> Быстрые формулы используются для ориентировочного расчета выборки участников при соблюдении определенных требований к выбору значений мощности, уровня значимости и величины клинически значимого эффекта, часто встречающихся в биофармацевтических исследованиях, и табулирования функции (пошаговое вычисление значений функции); например, допускается ориентировочная мощность 0,80 с уровнем альфа=0,05: для двустороннего *t*-теста,  $n=16s^2/d^2$ , где  $n$  – размер каждой выборки,  $s^2$  – дисперсия популяции,  $d$  – разница в эффектах  $=4sn$ ; для точного критерия Фишера или критерия  $\chi^2$ -квадрат:  $s^2=pq$ , где  $p=(p_1+p_2)/2$  и  $q=1-p$  и  $d=|p_1-p_2|$ .

<sup>10</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-338-350-tabl1>

Эталонным вариантом такого КИ является дизайн исследования терапевтической эффективности нового ЛС по сравнению с плацебо [17–24]. По ряду медицинских и этических причин такая схема не всегда применима, поэтому на практике часто осуществляют сравнение с группой пациентов, получающих стандартную терапию с использованием референтного препарата. Насколько терапия новым препаратом должна быть лучше плацебо или стандартной терапии, определяется пороговым значением, характеризующим наименьшую величину клинически значимой разницы терапевтического эффекта между сравниваемыми группами лечения (табл. 2).

На этапе расчета выборки необходимо предусмотреть визит оценки лечения, указать ожидаемую величину разницы (пороговое значение) для подтверждения превосходства, значение вариабельности основного показателя, величины ошибок I и II рода, приемлемые для исследования, с учетом экономической целесообразности и этических требований к количеству участвующих в исследовании пациентов.

Величина эффекта ( $\delta$ ) лечения подвержена значительным изменениям (вариабельности). Учитывая, что вариабельность основных показателей эффективности терапии может оказывать влияние на разницу в эффектах лечения в двух группах терапии, необходимо обосновать величину ожидаемого стандартного отклонения  $\sigma$  или дисперсии  $\sigma^2$  основного параметра на основе результатов пилотного исследования или опубликованных данных аналогичных исследований [1, 2, 4].

**Исследование эквивалентности.** Целью исследования эквивалентности является установление идентичности эффектов сравниваемых методов лечения (нулевое значение разницы между группами) [25–30]. Поскольку величина разницы внесена в знаменатель формулы расчета выборки (табл. 2), а деление на ноль невозможно, целью исследования эквивалентности будет определение того, лежит ли разница в эффектах между двумя методами лечения в пределах определенного небольшого интервала от  $-\delta$  до  $+\delta$ .

На этапе планирования важно указать величину разницы в эффектах лечения, которая будет являться пороговой величиной для принятия решения об эквивалентности [27–30]. В случае тестирования нового (оригинального) препарата лечения целесообразно максимально ограничить риски побочных эффектов от приема новой терапии, которая уступает стандартной терапии,

поэтому в качестве  $\delta$  следует указывать допустимо малое значение, которое в то же время продемонстрировало бы клинически значимый размер эффекта. По общему правилу  $\delta$  может составлять не более половины величины, которая может использоваться в исследовании превосходства [26].

В исследовании эквивалентности  $H_0$  состоит в том, что существует разница не менее  $\delta$ , а цель исследования – в том, чтобы отклонить  $H_0$  и принять  $H_1$  для доказательства отсутствия разницы в эффекте между методами лечения [26]. В дизайнах исследования превосходства и эквивалентности формулировка исследовательских гипотез (табл. 2) и метод оценки размера выборки имеют сходство, однако интерпретация определяемой величины  $\delta$  и выводы по результатам КИ различны:

Доказательство гипотезы эквивалентности предполагает двустороннее тестирование эффективности по основному показателю терапевтического ответа на лечение.

**Исследование не меньшей эффективности.**

Целью исследования не меньшей эффективности является доказательство того, что новая терапия не менее эффективна, чем стандартное лечение, которое применяется при изучаемой патологии. Следует доказать, что разница в терапевтическом эффекте тестируемого и референтного препарата не выходит за пределы величины  $\delta$ , установленной при планировании как пороговая величина, подтверждающая одинаковую эффективность лечения пациентов. По условию доказательства не меньшей эффективности новой терапии необходимо указать, что нижняя граница доверительного интервала для разницы в эффекте между сравниваемыми группами лечения находится выше установленной при планировании пороговой величины  $\delta$ . Положение верхней границы доверительного интервала в большинстве случаев не рассматривается как пороговая величина. В отдельных случаях это может применяться, если предполагается, что новая терапия может продемонстрировать лучший эффект, чем стандартная (референтная) терапия, однако размера ожидаемого эффекта недостаточно для определения превосходства.

Доказательство гипотезы не меньшей эффективности предполагает одностороннее тестирование (табл. 3). По этой причине необходимое количество пациентов в таком исследовании будет меньше, чем в случае исследования эквивалентности [31].

### Компьютерное программное обеспечение для расчета мощности и требуемого размера выборки

Для статистического анализа, оценки мощности и расчета размера выборки для различных дизайнов клинического исследования могут быть использованы следующие программные приложения [32]:

- пакеты прикладных программ для расчета мощности и размера выборки: GPOWER\*\*\*, NQUERY ADVISOR\*\*\*, PASS\*\*\*\*, PC-SIZE (CONSULTANT)\*, POWER AND PRECISION\*\*\*, POWPAL\*, POWERPACK\*\*, POWER PLANT\*\*, PS\*, STATISTICA\*\*, POWER ANALYSIS\*\*, STAT POWER\*\*\*, STPLAN\*;
- статистические пакеты прикладных программ общего назначения: DATASIM\*\*, JMP\*\*, MacANOVA\*, MSUSTAT\*, NCSS\*, SHAZAM\*, SigmaSTAT\*\*, STATISTICA\*, STATA\*, TRUE EPISTAT\*\*, WDIST\*;
- пакеты специализированных прикладных программ для расчета размера выборки: EX-SAMPLE\*\*, POWER AND EFFECT\*\*;
- пакеты специализированных прикладных программ для определения мощности: MONITOR\*\*, NSURV\*\*, TRENDS\*;
- приложения для решения общих универсальных задач: DATASIM\*\*, MS EXCEL\*\*\*, GLIM\*, SHAZAM\*, SAS\*, SIMSTAT, S-PLUS, XLISP-STAT.

Простота изучения и использования указанных программ варьирует от «сложно» (\*), «удовлетворительно» (\*\*), «хорошо» (\*\*\*) и «отлично» (\*\*\*\*).

Программные пакеты привлекательны тем, что результаты расчета размера выборки и мощности можно представить в формате готовых отчетов (листингов), включающих формулировки исследовательских гипотез, значения параметров и статистические характеристики, влияющие на изменение объема выборки и требуемые для обоснования численности субъектов исследования (например, мощности, величины эффекта и другие взаимосвязанные критерии), что упрощает выполнение рутинных процедур планирования КИ.

### Представление статистического плана в протоколе исследования

Расчет размера выборки субъектов осуществляется на этапе планирования дизайна и обобщается в протоколе исследования. Выбор

метода расчета размера выборки зависит от типа первичной конечной точки (непрерывной, категориальной и др.) и дизайна исследования (перекрестные, параллельные группы и др.).

Статистический план клинического исследования должен содержать следующую информацию:

- краткое описание целей исследования и дизайна исследования;
- первичные и вторичные конечные точки; гипотезы, подлежащие тестированию;
- уровень значимости и мощности исследования;
- подробное описание методов анализа, которые будут использоваться для анализа результатов и тестирования исследовательских гипотез;
- условия тестирования исследовательских гипотез (одно- или двустороннее);
- обоснование величины наименьшей клинически значимой разницы в эффектах и порогового значения для отклонения  $H_0$  в пользу  $H_1$ ;
- обоснование величин изменчивости (вариативности) основного эффекта, использованных в расчете размера выборки;
- обоснование продолжительности исследования и визита оценки терапевтического эффекта;
- обоснование коррекции потерь и методов восстановления данных выбывших субъектов исследования.

### Теоретические аспекты теории вероятности (байесовский подход)

Согласно рекомендациям Коллегии ЕЭК<sup>11</sup>, для обоснования ожидаемого эффекта терапевтического воздействия целесообразно использовать байесовский подход к анализу данных ранее проведенных исследований, то есть на основе априорной вероятности (вероятность правильности гипотезы до наступления события) осуществлять планирование проверки статистических гипотез и определение доверительного интервала вероятности апостериорного распределения интересующего эффекта вмешательства для принятия решения о доказательстве эффективности исследуемой терапии<sup>12</sup>.

Байесовский подход к определению размера выборки учитывает подходящие результаты распределения эффекта лечения предшествующего

<sup>11</sup> Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 03.11.2020 № 19 «О Руководстве по применению принципов биостатистики в клинических исследованиях лекарственных препаратов».

<sup>12</sup> Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 03.11.2020 № 19 «О Руководстве по применению принципов биостатистики в клинических исследованиях лекарственных препаратов».

Методические рекомендации «Применение математического моделирования в доклинических исследованиях в целях проведения клинических исследований с участием особых популяций», разработанные в рамках рабочей программы НИР ФГБУ НЦЭСМП по этапу № 2 НИР «Разработка руководств по проведению научной экспертизы новых и зарегистрированных лекарственных препаратов для медицинского применения». НИР 121021800098-4 от 06.12.2021.

исследования и позволяет рассчитать прогнозируемые результаты распределения для тестовой статистики и, следовательно, ожидаемые потери для любого заданного размера выборки [33–35, 37, 40, 41]. Такой подход является процедурой двойной оптимизации, позволяющей определить оптимальное решение для заданной величины тестовой статистики и размера выборки, а затем определить размер выборки, который дает наименьшие минимальные потери [34, 35]. Подход D.V. Lindley предполагает использование функций потерь при неправильном принятии решений на основе наблюдаемых данных и байесовский алгоритм, но применяется, когда имеют сходные представления и предшествующие значения исходов [33, 34]. Система J. Gittins и Н. Pezeshk представляет собой гибридную байесовско-частотную систему, согласно которой предполагается, что будущие реализации лекарственного препарата зависят от того, насколько впечатляющими являются результаты клинических испытаний (измеряемые значимостью различий), но при планировании используются предшествующие результаты распределения по терапевтическому эффекту и байесовский подход [35, 36]. Метод расчета О'Наган и соавт. – это обеспечение гарантий на основе байесовской вероятности, что КИ даст значимый результат [37]. Такой подход исключает зависимость от конкретного предполагаемого клинически значимого различия, но при этом использует предшествующее распределение фармакологического эффекта, чтобы гарантированно получить ожидаемую мощность.

Байесовские подходы являются вариантами прогнозирования результатов распределения для тестовой статистики на основе предшествующих исходов, обеспечения гарантий надежности и точности оценок, включая результаты доклинических испытаний, и принятия решений для заданной величины тестовой статистики и размера выборки для планируемого клинического исследования [33–39].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Расчет размера выборки участников является неотъемлемой частью планирования любого КИ. Обоснованный выбор основных критериев оценки и статистических моделей определяет необходимую мощность, качество проведения и последующей интерпретации результатов КИ. В обзоре подробно описаны критерии, термины и базовые статистические модели, определяющие корректность процедуры расчета размера выборки участников КИ в соответствии с рекомендациями Коллегии ЕЭК. Однако большое разнообразие заболеваний, особенностей патогенеза в различных популяциях, процедур диагностики, выбора терапевтических схем лечения, целевых оценочных шкал и целого ряда других характеристик вызывает необходимость применения специфических комбинаций планов КИ, следствием чего является востребованность в разработке дополнительных руководств и других информационных ресурсов, содержащих комментарии и примеры применения вероятностной статистики, и последующей гармонизации созданных национальных стандартов с международными.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Moher D, Dulberg CS, Wells GA. Statistical power, sample size, and their reporting in randomized controlled trials. *JAMA*. 1994;272(2):122–4. <https://doi.org/10.1001/jama.1994.03520020048013>
- Thabane L. *Sample size determination in clinical trials*. HRM-733 Class Notes. Hamilton: St Joseph's Healthcare, 2004.
- Altman DG. Statistics and ethics in medical research. III. How large a sample? *BMJ*. 1980;281(6251):1336–8. <https://doi.org/10.1136/bmj.281.6251.1336>
- Петри А, Сэбин К. *Наглядная статистика в медицине*. М.: ГЭОТАР-МЕД; 2003.
- Petrie A, Sabin K. *Medical statistics at a glance*. Moscow: GEOTAR-MED; 2003 (In Russ.).
- Zodpey SP. Sample size and power analysis in medical research. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2004;70(2):123–8. PMID: 17642587
- Araujo P, Frøyland L. Statistical power and analytical quantification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;847(2):305–8. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.002>
- Eng J. Sample size estimation: how many individuals should be studied? *Radiology*. 2003;227(2):309–13. <https://doi.org/10.1148/radiol.2272012051>
- Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. New York: Routledge; 1988. <https://doi.org/10.4324/9780203771587>
- Lenth RV. Some practical guidelines for effective sample size determination. *Am Stat*. 2001;55(3):187–93. <https://doi.org/10.1198/000313001317098149>
- Dubey SD. Some thoughts on the one-sided and two-sided tests. *J Biopharm Stat*. 1991;1(1):139–50. <https://doi.org/10.1080/10543409108835011>
- Bland JM, Altman DG. One and two sided tests of significance. *BMJ*. 1994;309(6949):248. <https://doi.org/10.1136/bmj.309.6949.248>
- Matthews JN. *Introduction to randomized controlled clinical trials*. New York: Chapman & Hall; 2006. <https://doi.org/10.1201/9781420011302>
- Lehr R. Sixteen S-squared over D-squared: a relation for crude sample size estimates. *Stat Med*. 1992;11(8):1099–102. <https://doi.org/10.1002/sim.4780110811>
- Machin D, Campbell MJ. *Statistical tables for the design of clinical trials*. Blackwell Scientific Publications; 1995. <https://doi.org/10.1002/sim.4780071211>
- Pocock SJ. *Clinical trials: a practical approach*. Wiley & Sons; 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118793916>
- Armitage P, Berry G. *Statistical methods in medical research*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 2002. <https://doi.org/10.1002/9780470773666>
- Fleiss JL. General design issues in efficacy, equivalency and superiority trials. *J Periodontol Res*. 1992;27(4 Pt 2):306–13. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1992.tb01684.x>
- Christensen E. Methodology of superiority vs. equivalence trials and non-inferiority trials. *J Hepatol*.

- 2007;46(5):947–54.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.02.015>
19. Garrett AD. Therapeutic equivalence: fallacies and falsification. *Stat Med.* 2003;22(5):741–62.  
<https://doi.org/10.1002/sim.1360>
  20. Blackwelder WC. “Proving the null hypothesis” in clinical trials. *Control Clin Trials.* 1982;3(4):345–53.  
[https://doi.org/10.1016/0197-2456\(82\)90024-1](https://doi.org/10.1016/0197-2456(82)90024-1)
  21. Greene WL, Concato J, Feinstein AR. Claims of equivalence in medical research: are they supported by the evidence? *Ann Intern Med.* 2000;132(9):715–22.  
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-132-9-200005020-00006>
  22. Costa LJ, Xavier AC, Giglio A. Negative results in cancer clinical trials – equivalence or poor accrual? *Control Clin Trials.* 2004;25(5):525–33.  
<https://doi.org/10.1016/j.cct.2004.08.001>
  23. Dimick JB, Diener-West M, Lipssett PA. Negative results of randomized clinical trials published in the surgical literature: equivalency or error? *Arch Surg.* 2001;136(7):796–800.  
<https://doi.org/10.1001/archsurg.136.7.796>
  24. Detsky AS, Sackett DL. When was a “negative” clinical trial big enough? How many patients you needed depends on what you found. *Arch Intern Med.* 1985;145(4):709–12.  
<https://doi.org/10.1001/archinte.1985.00360040141030>
  25. Djulbegovic B, Clarke M. Scientific and ethical issues in equivalence trials. *JAMA.* 2001;285(9):1206–8.  
<https://doi.org/10.1001/jama.285.9.1206>
  26. Jones B, Jarvis P, Lewis JA, Ebbutt AF. Trials to assess equivalence: the importance of rigorous methods. *BMI.* 1996;313(7048):36–9.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.313.7048.36>
  27. Lange S, Freitag G. Choice of delta: requirements and reality – results of a systematic review. *Biomed J.* 2005;47(1):12–27.  
<https://doi.org/10.1002/bimj.200410085>
  28. Durrleman S, Simon R. Planning and monitoring of equivalence studies. *Biometrics.* 1990;46(2):329–36.  
<https://doi.org/10.2307/2531438>
  29. Ebbutt AF, Frith L. Practical issues in equivalence trials. *Stat Med.* 1998;17(15–16):1691–701.  
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0258\(19980815/30\)17:15/16%3C1691::aid-sim971%3E3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0258(19980815/30)17:15/16%3C1691::aid-sim971%3E3.0.co;2-j)
  30. Wiens BL. Choosing an equivalence limit for noninferiority or equivalence studies. *Control Clin Trials.* 2002;23(1):2–14.  
[https://doi.org/10.1016/s0197-2456\(01\)00196-9](https://doi.org/10.1016/s0197-2456(01)00196-9)
  31. Chan A-W, Hróbjartsson A, Haahr MT, Gøtzsche PC, Altman DG. Empirical evidence for selective reporting of outcomes in randomized trials: comparison of protocols to published articles. *JAMA.* 2004;291(20):2457–65.  
<https://doi.org/10.1001/jama.291.20.2457>
  32. Thomas L, Krebs CJ. A Review of statistical power analysis software. *Bull Ecol Soc Am.* 1997;78(2):128–39.
  33. Lindley DV. The choice of sample size. *Statistician.* 1997;46(2):129–38.  
<https://doi.org/10.1111/1467-9884.00068>
  34. Lindley DV. A statistical paradox. *Biometrika.* 1957;44(1/2):187–92.  
<https://doi.org/10.2307/2333251>
  35. Gittins J, Pezeshk H. A behavioral Bayes method for determining the size of a clinical trial. *Drug Inf J.* 2000;34(2):355–63.  
<https://doi.org/10.1177/009286150003400204>
  36. Gittins J, Pezeshk H. How large should a clinical trial be? *J R Stat Soc Series D Stat.* 2000;49(2):177–87.  
<https://doi.org/10.1111/1467-9884.00228>
  37. O’Hagan A, Stevens JW, Campbell MJ. Assurance in clinical trial design. *Pharm Stat.* 2005;4(3):187–201.  
<https://doi.org/10.1002/pst.175>
  38. Шредер ОВ, Бунятян НД, Горячев ДВ, Субаев РД, Енгальчева ГН, Кузнецова АД, Косенко ВВ. Математическое прогнозирование эффективности лекарственных средств в доклинических исследованиях. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2022;12(3):315–30.  
 Shreder OV, Bunyatyan ND, Goryachev DV, Subaev RD, Engalcheva GN, Kuznetsova AD, Kosenko VV. Mathematical prediction of the efficacy of medicinal products in preclinical studies. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2022;12(3):315–30 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-3-315-330>
  39. Каркищенко НН. *Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармако моделирования.* М.: Межкадаемическое издательство ВПК; 2007.  
 Karkishchenko NN. *Biomedicine alternatives. Part 1. Basic principles of biomedicine and pharmacomodeling.* Moscow: Interacademic Publishing House of the Military Industrial Complex; 2007 (In Russ.).  
 EDN: [SOPUYN](https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-3-315-330)
  40. Senn S. Determining the sample size. In: *Statistical issues in drug development.* John Wiley & Sons; 2007.  
<https://doi.org/10.1002/9781119238614.ch13>
  41. Julious SA. Designing clinical trials with uncertain estimates of variability. *Pharm Stat.* 2004;3(4):261–8.  
<https://doi.org/10.1002/pst.139>

**Дополнительная информация.** На сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» размещена таблица 1.  
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-338-350-tabl1>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: О.В. Шредер – разработка концепции, написание текста рукописи, редактирование, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; Д.В. Горячев – критический пересмотр текста рукописи, утверждение варианта для публикации; В.А. Меркулов – утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

**Additional information.** Table 1 is posted on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*.  
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-338-350-tabl1>

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Olga V. Shreder* conceptualised the study, drafted and edited the manuscript, and approved the final version for publication. *Dmitry V. Goryachev* critically revised the manuscript and approved the final version for publication. *Vadim A. Merkulov* approved the final version of the manuscript for publication.

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Шредер Ольга Васильевна, канд. биол. наук / **Olga V. Shreder**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7926-6033>

Горячев Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук / **Dmitry V. Goryachev**, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8583-2372>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук / **Vadim A. Merkulov**, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 11.12.2023

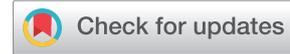
После доработки 08.04.2024

Принята к публикации 10.04.2024

Received 11 December 2023

Revised 8 April 2024

Accepted 10 April 2024



А.П. Соловьева   
И.М. Сурмило 

## Программа изучения лекарственных препаратов для лечения генерализованного тревожного расстройства: анализ Рекомендаций Европейского агентства по лекарственным средствам

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

✉ Соловьева Анна Петровна; [soloviova@exppmed.ru](mailto:soloviova@exppmed.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Генерализованное тревожное расстройство (ГТР) является наименее изученным из ряда тревожных расстройств ввиду наличия у пациентов сопутствующей патологии, связанной с расстройствами настроения. Поиск эффективных методов лечения ГТР является крайне важной задачей, что и обуславливает актуальность разработки новых лекарственных препаратов для лечения ГТР. Надлежащее планирование программы проведения клинических исследований является залогом получения достоверных данных об эффективности и безопасности лекарственных препаратов. В настоящий момент методическое руководство по проведению клинических исследований ГТР в Российской Федерации отсутствует и поставлена задача его разработки.

**ЦЕЛЬ.** Оценка возможности использования методологических подходов зарубежных руководящих документов к проведению клинических исследований лекарственных средств в российской клинической практике при разработке лекарственных средств для терапии генерализованного тревожного расстройства.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Выполнен анализ основных положений Руководства по клиническим исследованиям препаратов для терапии ГТР Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA). Описаны основные этапы клинических исследований лекарственных препаратов и методология использования результатов этих исследований для оценки эффективности и безопасности данной группы препаратов. Показано, что при разработке программы клинических исследований ГТР необходимо учитывать этапность проведения исследований, обязательной является долгосрочная оценка безопасности и аддитивного эффекта. Выделены аспекты выбора дизайна клинических исследований, формирования групп исследований, а также определения первичных и вторичных конечных точек исследований. Особый акцент сделан на учете коморбидности пациентов.

**ВЫВОДЫ.** Положения руководства EMA могут послужить основой отечественного руководства по изучению лекарственных препаратов для лечения генерализованного тревожного расстройства.

**Ключевые слова:** генерализованное тревожное расстройство; клиническое исследование; дизайн исследования; коморбидность; психические расстройства; шкала тревоги Гамильтона; шкала общего клинического впечатления; шкала инвалидности Шихана; планирование клинического исследования; руководство EMA

**Для цитирования:** Соловьева А.П., Сурмило И.М. Программа изучения лекарственных препаратов для лечения генерализованного тревожного расстройства: анализ Рекомендаций Европейского агентства по лекарственным средствам. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):351–361. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-351-361>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0).

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Anna P. Solovyova   
Irina M. Surmilo 

## Programme for Studying Medicinal Products for Generalised Anxiety Disorder: Analysis of the European Medicines Agency Guideline

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

✉ Anna P. Solovyova; [soloviova@expmed.ru](mailto:soloviova@expmed.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Generalised anxiety disorder (GAD) is the least studied anxiety disorder, as patients present with comorbid mood disorders. Finding effective treatment methods for GAD is of the utmost importance; therefore, it is essential to develop novel medicinal products for GAD. Proper clinical programme design is key to obtaining reliable data on the effectiveness and safety of a medicinal product. Currently, the Russian Federation lacks methodological guidelines for clinical studies of these medicinal products, and there is a need for developing such guidelines.

**AIM.** This review aimed to assess the possibility of applying the methodological approaches described in international guidelines to Russian clinical trials to develop medicinal products for GAD.

**DISCUSSION.** Having analysed the main provisions of the Guideline on the clinical investigation of medicinal products indicated for generalised anxiety disorder by the European Medicines Agency (EMA), the authors of this review outlined the main stages of clinical development and the methodology for using clinical data to evaluate the safety and efficacy of medicinal products for GAD. Clinical development programmes for these medicinal products should take into account research staging and mandatory long-term safety and additive effect assessments. This review highlights aspects of selecting the design, population, and primary and secondary endpoints for a clinical trial. Particular attention is paid to the consideration of comorbidities in patients.

**CONCLUSION.** The provisions set forth in the EMA guideline can inform the development of national guidelines for studying medicinal products for GAD.

**Keywords:** generalised anxiety disorder; clinical trial; study design; co-morbidity; mental health issues; Hamilton Anxiety Rating Scale; Clinical Global Impression Scale; Sheehan Disability Scale; clinical trial planning; EMA guidelines

**For citation:** Solovyova A.P., Surmilo I.M. Programme for studying medicinal products for generalised anxiety disorder: analysis of the European Medicines Agency Guideline. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):351–361. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-351-361>

**Funding.** The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00026-24-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D reporting No. 124022300127-0).

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

### ВВЕДЕНИЕ

Термин «генерализованное тревожное расстройство» (ГТР) был введен в терминологию психиатрии в 1980 г. при публикации третьего издания Диагностического и статистического руководства по психическим расстройствам (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) (далее — DSM III)<sup>1</sup>. ГТР является наиболее распространенным тревожным расстройством в структуре первичной медико-санитарной помощи. Частота встречаемости ГТР среди

пациентов, обращающихся за первичной медико-санитарной помощью, составляет ~8%. В европейских странах согласно данным четвертого издания DSM (DSM IV)<sup>2</sup> распространенность ГТР в популяции в целом составляет 5–6%, у женщин в возрасте 40 лет и старше этот показатель достигает 10%, у пожилых людей в целом (в возрасте 55–85 лет) — 7%.

ГТР является наименее изученным из всех тревожных расстройств из-за высокой сочетаемости с другими расстройствами настроения.

<sup>1</sup> Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 3rd ed. Washington DC: American Psychiatric Association; 1980.

<sup>2</sup> Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th ed. Washington DC: American Psychiatric Association; 1994.

На данный момент получены данные о роли в патогенезе ГТР чрезмерной активности норадренергической системы и низкой плотности бензодиазепиновых рецепторов. Также исследуется вовлеченность иммунной системы, поскольку постоянные тревожные руминации могут приводить к высвобождению цитокинов и поддержанию «тлеющих воспалительных реакций» в организме [1].

Цель работы – оценка возможности использования методологических подходов зарубежных руководящих документов к проведению клинических исследований лекарственных средств в российской клинической практике при разработке лекарственных средств для терапии генерализованного тревожного расстройства.

Работа выполнена методом информационно-аналитического поиска с использованием данных научной литературы (анализировали научные базы РИНЦ, Scopus, PubMed, Wiley (2010–2023)), а также российских и зарубежных клинических рекомендаций по терапии ГТР.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### Общая характеристика генерализованного тревожного расстройства

Генерализованное тревожное расстройство – это состояние, проявляющееся распространенной и постоянной тревогой и напряжением, которые не ограничены или не связаны с какими-либо особыми окружающими обстоятельствами («свободно плавающая тревога»). Определяющими признаками ГТР являются чрезмерная тревога и беспокойство, диагноз может быть установлен только при условии наличия выраженных нарушений в социальной сфере, профессиональной сфере и функциональных нарушений, которые сохраняются в течение минимум 6 мес. (согласно критериям DSM IV наличие функциональных нарушений не является необходимым при постановке диагноза, если значительные клинические признаки заболевания очевидны). ГТР имеет хроническое или рекуррентное течение и может способствовать развитию выраженной социальной дезадаптации и повышению риска развития суицида. Продолжительность состояния составляет не менее 6 мес., оно не поддается сознательному контролю, его невозможно контролировать волевым усилием или рациональными доводами, при этом степень

тревожных переживаний не соответствует текущей жизненной ситуации пациента [2].

Для классификации и диагностики ГТР как у взрослых, так и у детей в настоящее время во всем мире используются две основные классификации, имеющие статус международных: МКБ-10, выпущенная под руководством Всемирной организации здравоохранения<sup>3</sup>, и разработанная Американской психиатрической ассоциацией (American Psychiatric Association) DSM V<sup>4</sup>. В Российской Федерации по МКБ-10 диагноз указывается как «F41.1 – Генерализованное тревожное расстройство». Наличие двух классификаций и различия диагностических критериев в России и других странах определяют необходимость унификации классификации данного заболевания с целью выработки единой стратегии постановки диагноза, что крайне важно при клиническом исследовании лекарственных препаратов для терапии ГТР.

По данным литературы в мире распространенность ГТР составляет от 0,1 до 8,5% и в среднем отмечена в ~5% случаев среди взрослой популяции. Доля ГТР среди иных тревожных расстройств составляет от 12 до 25%. Более высокая распространенность отмечена у женщин (в среднем в 3 раза чаще, чем у мужчин). Чаще всего ГТР манифестирует в возрастном диапазоне между 21,1 и 34,9 годами [3–7].

Факторами риска развития ГТР являются [8–10]:

- личностные особенности: осторожность в поведении в незнакомой ситуации, негативная аффективность и повышенная настороженность, стремление избежать возможного реального или воображаемого вреда;
- социальные факторы (на данный момент не установлен специфический психосоциальный фактор, связанный с возникновением ГТР, несмотря на то что у пациентов с ГТР чаще встречается такой тип воспитания, как гиперпротекция, и частые психотравмирующие воздействия в детском возрасте);
- генетические и физиологические факторы: ГТР относится к полигенным мультифакторным заболеваниям, ведется исследование генетических полиморфизмов, отвечающих за развитие ГТР. Доля генетических факторов, играющих роль в развитии ГТР, составляет около 30%, однако эти же генетические факторы определяют негативную аффективность и оказывают влияние на развитие иных аффективных расстройств, в первую очередь

<sup>3</sup> МКБ-10. Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем. 10-й пересмотр. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 1995.

<sup>4</sup> Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. Washington DC: American Psychiatric Association; 2013.

депрессивного. По имеющимся данным, генетический риск для женщин в два раза выше, чем для мужчин.

Часто пациенты обращаются к врачам первичного звена с соматическими проявлениями тревоги, игнорируя психопатологические проявления. Пациенты с ГТР могут иметь множество жалоб со стороны различных органов и систем организма. В последние годы была накоплена обширная доказательная база, позволившая предоставить надежные рекомендации по лечению панического расстройства, агорафобии, ГТР, социального тревожного расстройства, специфических фобий, смешанных тревожных расстройств у детей и подростков. В большинстве случаев лечение может существенно улучшить качество жизни пациентов с этими расстройствами.

Значимые социальные последствия ГТР, включая опасность развития острых и угрожающих жизни состояний, выраженную физическую и социальную дезадаптацию пациентов, трудности в диагностике ГТР, отчетливое негативное влияние на качество жизни людей (снижение социальных связей, ухудшение межличностных отношений), значительное повышение риска суицидального поведения, наличие выраженных и значительных побочных реакций при применении существующих методов лекарственной терапии ГТР, необходимость длительной терапии, являются основанием обоснования важности и актуальности разработки новых лекарственных препаратов, предназначенных для лечения ГТР.

Возможность применения в терапии тревожных расстройств в США и Европейском союзе изучена для более чем 15 различных групп лекарственных препаратов [11]. Существующие стандарты лечения ГТР включают использование бензодиазепинов (формально предназначенных только для краткосрочного применения) и других одобренных краткосрочных фармакотерапевтических методов лечения, наиболее часто применяются препараты группы антидепрессантов (преимущественно пароксетина и венлафаксина). Применение препаратов группы бензодиазепинов обычно ограничено из-за их способности вызывать выраженную седацию, зависимость, привыкание и перекрестную толерантность к алкоголю. Следует отметить, что поскольку ГТР является заболеванием с преимущественно хроническим течением, лечение должно быть продолжительным и не ограничиваться

краткосрочным применением лекарственных препаратов.

В России Министерством здравоохранения утверждены клинические рекомендации по диагностике и лечению ГТР<sup>5</sup>, в то же время существует потребность поиска новых препаратов для фармакотерапии этого заболевания. В Российской Федерации и Евразийском экономическом союзе (ЕАЭС) отсутствуют нормативные документы и методические рекомендации, руководства по планированию исследований и оценке эффективности и безопасности новых лекарственных средств для терапии ГТР. В связи с этим существует необходимость в разработке таких документов, регламентирующих порядок проведения процедур и необходимый объем данных, которые должны быть представлены при регистрации новых лекарственных препаратов для лечения ГТР.

Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) в 2005 г. было разработано руководство, регламентирующее базовые принципы и ключевые аспекты проведения доклинических и клинических исследований новых лекарственных препаратов для лечения ГТР. В данном руководстве отражены основные этапы изучения лекарственных препаратов для лечения ГТР, начиная с ранних этапов и заканчивая постмаркетинговыми исследованиями<sup>6</sup>.

### **Основные положения «Руководства по клиническому изучению лекарственных препаратов, предназначенных для лечения генерализованного тревожного расстройства» (EMA)**

**Ранние клинические этапы разработки.** Задачей этих этапов исследования является изучение фармакодинамических и фармакокинетических свойств лекарственных препаратов у здоровых добровольцев и у пациентов особых групп, а также лекарственных взаимодействий нового препарата, в особенности с препаратами, которые обычно применяются при лечении ГТР. Обязательным является изучение взаимодействия лекарственных препаратов с алкоголем и другими препаратами, влияющими на центральную нервную систему.

Фармакодинамические исследования должны включать оценку механизма, начала и продолжительности фармакологического действия, а также предварительное исследование переносимости/

<sup>5</sup> Генерализованное тревожное расстройство. Клинические рекомендации. М.: Российское общество психиатров: 2021.

<sup>6</sup> Guideline on the clinical investigation of medicinal products indicated for generalised anxiety disorder. CPMP/EWP/4284/02. EMA; 2005.

безопасности. Фармакодинамическая активность нового лекарственного препарата должна быть изучена в максимально возможном объеме. Специфичная модель для изучения фармакологической активности и механизма действия препаратов, разрабатываемых для лечения ГТР, не установлена. Наиболее часто используются модели, предназначенные для оценки психотропного действия препаратов, в частности антидепрессантов и анксиолитиков. При определении переносимости и оценке нежелательных реакций исследуемого препарата могут быть информативными исследования по оценке состояния когнитивных функций, определению времени реакции и структуры сна.

Помимо стандартных фармакокинетических исследований, необходимых при оценке фармакокинетики любого фармакологического препарата, особенно в исследованиях по оценке зависимости «доза–эффект», должен оцениваться уровень содержания действующего вещества, а при необходимости и метаболитов, обладающих фармакологической активностью в плазме крови.

**Оценка эффективности.** При планировании клинических исследований классификацию указанного заболевания необходимо проводить в соответствии с международной классификационной системой, целесообразно использование критериев DSM. Следует использовать эту же систему при полной программе разработки лекарственного препарата.

ГТР является заболеванием с хроническим течением, лечение данной патологии должно быть продолжительным, что должно быть учтено при проведении клинических исследований для оценки долгосрочной эффективности и безопасности.

Диагноз устанавливается врачом-психиатром на основании шкалы оценки степени тяжести ГТР (Generalised Anxiety Disorder-7) и должен быть подтвержден структурированным опросом пациента. У пациентов с наличием тревожного расстройства чаще диагностируются артериальная гипертензия и другие заболевания со стороны сердечно-сосудистой системы, заболевания желудочно-кишечного тракта, артриты, заболевания щитовидной железы и др., что должно учитываться при включении в исследование пациентов с наличием сопутствующей патологии, а следовательно, и препаратов сопутствующей терапии. Следует учитывать и дополнительные

параметры, такие как тяжесть заболевания, анамнез, продолжительность ГТР и предыдущий исход лечения.

При диагностике ГТР возможно использование следующих методов:

- клинический метод, включающий клинико-anamnestический аспект; клинико-психопатологический аспект; клинико-патогенетический аспект;
- экспериментально-психологический метод;
- инструментальные и лабораторные методы (электроэнцефалографический, биохимический, нейропсихологический, метод лучевой диагностики – магнитнорезонансная томография головного мозга).

Основная стратегия терапии ГТР заключается в сочетании психофармакотерапии и психотерапии [12]. Согласно рекомендациям целевой группы Всемирной федерации обществ биологической психиатрии (World Federation of Societies of Biological Psychiatry, WFSBP) по лечению тревожных, обсессивно-компульсивных и посттравматических стрессовых расстройств<sup>7</sup>, препаратами первой линии для лечения ГТР являются селективные ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина (венлафаксин, дулоксетин) и селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (эсциталопрам, пароксетин и сертралин). Также в качестве эффективных препаратов указаны агомелатин и имипрамин. Доказана эффективность прегабалина, однако этот препарат назначают в качестве препарата второй линии терапии в связи с высоким риском злоупотребления. При неэффективности или плохой переносимости лечения препаратами первой линии могут быть рассмотрены в качестве терапии препараты бензодиазепина [11]. Для проведения психофармакологического и психотерапевтического лечения существуют определенные показания и противопоказания, которые в основном связаны с состоянием пациента, появлением побочных эффектов и условиями проведения комплексной терапии.

Дизайн клинических исследований по изучению лекарственных препаратов должен учитывать целевую популяцию пациентов, а также сопутствующие заболевания. Количество испытуемых определяется для каждого конкретного препарата, зависит от фармакотерапевтической группы, предполагаемых механизмов действия и целевых показателей применения в лечении ГТР.

<sup>7</sup> World Federation of Societies of Biological Psychiatry guidelines for treatment of anxiety, obsessive-compulsive and posttraumatic stress disorders. WFSBP; 2022.

Основным критерием включения в КИ является установленный диагноз. Должны быть использованы дополнительные описательные параметры, такие как тяжесть заболевания, подробный анамнез заболевания, например продолжительность ГТР и предыдущий исход лечения. Кроме того, в качестве критериев включения могут быть использованы пороговые значения по соответствующей шкале степени тяжести заболевания.

Важным фактором является гомогенность исследуемой популяции по подбору дозы в базовых исследованиях. Однако ввиду высокой коморбидности с другими психиатрическими заболеваниями у пациентов с ГТР сделать такую выборку пациентов может оказаться затруднительным.

В ряде случаев критерием невключения является наличие сопутствующих заболеваний. Зачастую ГТР связано с иными психическими расстройствами (около 17% пациентов с ГТР сообщали о наличии большого депрессивного расстройства на протяжении жизни). Включение пациентов с некоторыми психическими заболеваниями в клинические исследования препаратов, разрабатываемых при терапии ГТР, может привести к получению невалидных данных о новом препарате. Так, в исследование не могут быть включены:

- пациенты с текущим или недавно перенесенным тяжелым депрессивным расстройством (в течение 6 мес. до включения в исследование);
- пациенты с преобладанием и (или) с тяжелыми симптомами депрессии (например, не соответствующие критериям DSM IV). Пациенты с легкими симптомами депрессии (низкие показатели степени тяжести заболевания, например <2 по пункту 1 Шкалы Гамильтона для оценки депрессии (Hamilton Rating Scale for Depression, HDRS)) в исследование могут быть включены;
- пациенты с тяжелыми/серьезными/выраженными симптомами иных тревожных расстройств;
- пациенты с тяжелыми/серьезными/выраженными симптомами обсессивно-компульсивного расстройства;
- пациенты, имеющие в анамнезе психическое заболевание, либо с его наличием на данный момент;
- пациенты с биполярным расстройством;
- пациенты с начальным или тяжелым пограничным расстройством личности;
- пациенты, страдающие хроническим алкоголизмом либо имеющие зависимость в настоящий момент / недавней зависимостью от психоактивных веществ в анамнезе (в течение последних 6 мес.).

У пациентов с ГТР часто отмечаются другие тревожные расстройства, которые могут рассматриваться в качестве дифференциального диагноза. ГТР ассоциировано со сниженным общим показателем эмоционального состояния и отмеченными признаками снижения занятости и соответствующей повышенной зависимости в социальной помощи, нарушением социальной жизни (например, ограничение дружеских контактов или количества досуга) и сниженными показателями уровня удовлетворенности жизнью. Необходимо учитывать, что ГТР связано с наличием выраженных нарушений со стороны психосоциальной сферы и оказывает значительное негативное влияние на качество жизни. Таким образом, при определении популяции пациентов необходимо это учитывать и предусматривать дополнительные параметры оценки на этапе скрининга пациентов.

Также следует отметить, что пациенты с ГТР могут иметь множество соматических жалоб со стороны организма в целом, что следует учесть при разработке критериев включения/невключения. Целесообразно включение в исследование амбулаторных пациентов, поскольку пациенты с ГТР практически всегда являются амбулаторными пациентами.

**Исследования II фазы и подтверждающие исследования.** Результаты исследований, соответствующие второму этапу клинических исследований препаратов и являющиеся первым применением препарата у пациентов с ГТР, следует рассматривать не только в аспекте клинической значимости, но также и относительно статистической достоверности. В случае наличия статистически значимого выраженного эффекта/воздействия, нечувствительного к применяемому методу анализа, результат должен быть рассмотрен с клинической точки зрения в зависимости от цели исследования. Основой для оценки соотношения «польза–риск» является значимость выявленного эффекта воздействия. Это следует учитывать при определении размера выборки КИ.

Эффективность лекарственного препарата для лечения ГТР должна оцениваться с помощью специализированных валидированных шкал оценки. Выбор шкал оценки определяется соответствием критериям достоверность/надежность, валидность, также должна быть известна чувствительность шкалы к изменениям состояния при применении препарата. Для оценки уровня тревоги широко используется Шкала Гамильтона (Hamilton Anxiety Rating Scale,

HARS/Ham-A), хотя она и не является оптимальной шкалой оценки. Может оказаться полезным проведение структурированного (стандартизованного) опроса. Общая шкала этого опроса может быть использована в качестве первичной конечной точки, в то время как показатель психической тревожности по шкале HARS/Ham-A может быть удобен в качестве вторичной конечной точки. Могут быть использованы и другие валидированные шкалы оценки.

Улучшение симптоматики (разница между исходным показателем и показателем после проведения лечения) должно быть подтверждено и соответствующим образом описано, также должно быть отмечено соотношение количества пациентов, ответивших на лечение (пациенты, у которых отмечено клинически значимое снижение относительно исходных показателей по шкале первичных результатов) и находящихся в ремиссии (состояние, при котором отсутствуют либо наблюдаются лишь незначительные симптомы заболевания). В протоколе клинического исследования должны быть определены предельные значения по валидированной шкале оценки, и они должны быть обоснованы (как для оценки ответа на лечение, так и для ремиссии).

В качестве вторичной конечной точки может быть использована общая оценка (например, 1 или 2 балла по Шкале общего клинического впечатления (Clinical Global Impression Scale, CGI)). Также в качестве вторичных конечных точек могут быть использованы иные шкалы с установленной эффективностью, например Шкала инвалидности Шихана (Sheehan Disability Scale, SDS).

Дополнительными критериями эффективности могут быть:

- изменения по Шкале Гамильтона (HARS/ Ham-A) для психических и соматических факторов тревожности по сравнению с исходным уровнем;
- тяжесть заболевания по Шкале общего клинического впечатления (CGI);
- оценка показателя качества жизни для данной популяции пациентов.

#### **Терапевтические подтверждающие исследования.**

В терапевтических подтверждающих исследованиях при оценке зависимости «доза–эффект» для установления нижней границы диапазона клинически эффективной дозы, а также оптимальной дозы необходимо проведение исследований контролируемых, в параллельных группах при приеме фиксированных доз, как минимум для трех режимов дозирования. Целесообразно

включение группы приема плацебо, а также активной группы сравнения.

#### **Краткосрочные и долгосрочные исследования.**

Для оценки эффекта лекарственных средств, как правило, необходимо проведение краткосрочных (не менее 8 недель), в параллельных группах, двойных слепых рандомизированных плацебо-контролируемых исследований, а также сравнение с эталонным/референтным препаратом в адекватной дозировке при исследовании в трех группах сравнения. Выбор дозы и выбор препарата сравнения должны быть тщательно обоснованы. Препараты сравнения следует выбирать из препаратов, разрешенных к применению по данному показанию в диапазоне доз, которые предусмотрены дизайном клинического исследования.

Использование плацебо может неоднозначно рассматриваться с этической точки зрения, однако его применение необходимо для демонстрации однозначного эффекта нового препарата, поскольку эффект при КИ с использованием групп плацебо может быть выраженным и чувствительным к дизайну исследований. Как правило, период приема плацебо для исключения лиц, ответивших на плацебо, бесполезен и может ухудшить обобщение результатов. Если пациенты уже получают лечение активным препаратом, может потребоваться отмывочный период. Следует тщательно анализировать любую причину исключения лиц, принимавших плацебо.

Размер выборки должен быть обоснован с учетом клинических данных (клинически выраженное улучшение от первоначального уровня по первичной конечной точке), а также относительно статистических показателей. Статистический анализ должен сочетать различные методы анализа. В качестве первичного параметра, подлежащего анализу, рассматривают анализ назначенного лечения, необходимо изначально предусмотреть обработку выбывших и недостающих данных и описать методологию этой обработки в протоколе КИ. Следует учитывать риск недооценивания или переоценивания эффекта.

Дополнительная психотерапия, психологическая поддержка или консультирование должны быть изначально предусмотрены в протоколе исследования, и должно быть проанализировано их влияние на результат лечения, однако психотерапевтическое лечение может быть исключено, поскольку это может повлиять на величину эффекта.

В дополнение к краткосрочным необходимо проведение долгосрочных исследований, демонстрирующих, что эффект препарата сохраняется с течением времени. Оптимальным дизайном для демонстрации сохранения эффекта является рандомизированное КИ отмены препарата, состоящее из первой фазы исследования, во время которой пациентам назначается лечение (чаще всего открытое исследование без ослепления, 2–6 мес.), и второй фазы – добровольцы, принявшие участие в первой фазе, распределяются в группы плацебо и одной или нескольких групп активного сравнения (6–12 мес.). В начале периода проведения рандомизированной фазы существует вероятность необходимости снижения дозы препарата для предотвращения развития синдрома отмены. В рандомизированном исследовании отмены критериями эффективности обычно являются число пациентов с ухудшением состояния (рецидивом) и (или) время до наступления данного события. Необходимо учитывать оба указанные критерия эффективности. Анализ должен быть проведен с надлежащим учетом возможных отклонений, которые могут происходить в результате отсева (не из-за рецидива), используя статистические методы, позволяющие устранить их. В протоколе исследования необходимо отразить наличие ухудшения или рецидива, которые характеризуются клинически выраженным усилением симптомов, оцениваемым по утвержденной шкале оценки, регистрируемых во время одного или нескольких визитов.

**Планирование исследования у пациентов в особых группах.** Хотя уровень распространенности ГТР среди пожилых людей, по-видимому, выше, проявления ГТР среди пациентов в этой популяции существенно не отличаются от проявлений в популяции более молодого возраста. В руководстве Международного совета по гармонизации (ICH) по проведению клинических исследований<sup>8</sup> указано, что сведения об эффективности и безопасности препаратов для пожилых пациентов могут быть получены из общей базы данных, без проведения дополнительных исследований, если только нет особых причин этого не делать, однако решение о непроведении подобных исследований должно быть обосновано.

Ввиду особенностей фармакокинетических свойств лекарственного препарата и (или) различной чувствительности к лекарственному препарату пожилых пациентов могут возникать

затруднения при экстраполяции дозы. По этой причине ключевой проблемой, в особенности при отсутствии исследований у данной популяции, становится установление безопасной дозы (диапазона) для пожилых пациентов. Задачу выбора безопасной и эффективной дозы следует решить перед регистрацией лекарственного препарата. Это можно реализовать двумя способами: путем анализа общей базы данных либо проведением собственных клинических исследований в особых группах пациентов. Первый вариант может быть применен для получения основной информации о лекарственных препаратах изученных фармакологических групп при условии включения в анализируемое исследование достаточного числа пациентов пожилого возраста, что обеспечивает проведение проспективного анализа подгрупп. Проведение собственных исследований может быть необходимо при разработке новых препаратов с новым механизмом действия. При выборе дизайна исследования оптимальным является проведение плацебо-контролируемого исследования по оценке зависимости «доза–эффект». В то же время в обеих ситуациях для подбора дозы должны быть проведены фармакокинетические исследования.

Несмотря то что ГТР практически не встречается у детей, а среди подростков отмечена низкая частота встречаемости данной патологии (по DSM IV ~1%), и в настоящее время увеличилось количество проводимых исследований в данной возрастной группе, опыт применения препаратов в данной группе невелик. В указанной популяции пациентов ГТР чаще всего рассматривается в контексте другого расстройства. По данной причине проведение исследований у детей крайне затруднительно, при этом полученные данные не могут быть обобщены. В соответствии с программами разработки лекарственных препаратов в педиатрии исследования могут проводиться при постмаркетинговом применении после регистрации для применения препарата у взрослой популяции.

Шкалы оценки должны быть специфичны и валидированы для данной возрастной популяции. Следует учитывать разницу в развитии нежелательных явлений, наблюдаемых у взрослых, у детей и подростков. Кроме того, в соответствии с руководством по педиатрическим исследованиям<sup>9</sup> следует учитывать влияние разрабатываемых препаратов, предназначенных

<sup>8</sup> ICH guideline E8 (R1) on general considerations for clinical studies. EMA/CHMP/ICH/544570/1998. EMA; 2021.

<sup>9</sup> ICH E11(R1) guideline on clinical investigation of medicinal products in the pediatric population. EMA/CPMP/ICH/2711/1999. EMA; 2017.

для лечения ГТР, на когнитивные функции, процессы обучения, развитие, рост, половое созревание, эндокринные функции и общее функциональное состояние организма детей. Когнитивные способности и способность к обучению необходимо изучить перед регистрацией препарата с применением утвержденных тестов, валидированных в соответствии с возрастом и группой пациентов. КИ в данной возрастной группе пациентов должны быть подкреплены соответствующими фармакокинетическими исследованиями.

**Изучение профиля безопасности препаратов.** Общий клинический опыт, как правило, должен включать данные о применении препарата у крупной и репрезентативной группы пациентов, а в качестве дополнительной информации по безопасности по приведенному показанию также могут быть использованы соответствующие данные, полученные в ходе исследований по иным показаниям.

Побочные эффекты, отмеченные в ходе проведения клинических исследований, подлежат тщательному контролю и мониторингу, необходимо описание данных побочных эффектов с указанием продолжительности лечения, дозы и (или) уровня вещества (метаболита) в плазме крови, времени восстановления, возраста, иных переменных. Должен быть проведен анализ побочных реакций на лекарственные препараты, случаи выбывания пациентов из исследования и пациентов, умерших во время проведения исследования.

Поскольку в патогенезе заболевания определенная роль принадлежит нейромедиаторам серотонину и дофамину, следует заранее учитывать и оценивать (преимущественно с использованием специализированных шкал) возможные побочные реакции, связанные с данными нейромедиаторами (к примеру, серотонинергический синдром, экстрапирамидные симптомы). Кроме того, необходимым является исследование взаимодействия препаратов с иными системами рецепторов (например, норадренергическими, холинергическими и гистаминергическими рецепторами). При необходимости клиническое наблюдение следует дополнить проведением соответствующих тестов. С целью оценки переносимости проводимой терапии необходимо проведение тщательного наблюдения в группах детей и подростков и пожилых пациентов. Должны быть представлены любые имеющиеся сведения о клинических симптомах и терапевтических способах купирования возможной

передозировки лекарственным препаратом или случайном приеме.

**Специфические нежелательные явления.** При прекращении приема лекарственного препарата могут наблюдаться эффект рикошета и (или) отмены препарата. С целью оценки риска развития синдрома отмены либо рецидива заболевания необходимо предусмотреть как минимум одно посещение после прекращения проводимой терапии.

При изучении новых действующих веществ необходимо проведение как минимум одного краткосрочного и одного долгосрочного исследования, включая короткий период отмены, для выявления возможных симптомов отмены. Данные явления могут быть выявлены при проведении рандомизированного исследования отмены, при котором терапия резко отменяется и затем осуществляется наблюдение за пациентами в течение определенного времени с целью выявления возможного рецидива заболевания и развивающихся симптомов синдрома отмены. Следует отметить, что при изучении новых действующих веществ для определения возможности развития лекарственной зависимости либо при наличии признаков возможного возникновения зависимости необходимо проведение доклинических исследований на животных. При этом необходимо учитывать тот факт, что хроническое течение ГТР само по себе повышает риск развития зависимости.

**Нежелательные реакции со стороны центральной нервной системы.** В соответствии с классом исследуемого лекарственного препарата и возможных взаимодействий с различными рецепторами необходимо учитывать степень оказываемого седативного эффекта, влияния на когнитивные функции, скорость реакции и (или) способность управлять транспортными средствами и механизмами.

При проведении КИ необходимо учитывать, что, по данным литературы, тревожность и связанные с ней расстройства связаны с увеличением в 1,7–2,5 раза риска суицидальных попыток [13, 14]. Повышенный риск суицидальных попыток отмечен при ГТР [15] даже при отсутствии сопутствующего расстройства настроения. Эти данные свидетельствуют о том, что пациенты с тревожным расстройством нуждаются в тщательной оценке суицидального риска. Следует тщательно контролировать суицидальное поведение, особое внимание следует уделить попыткам суицида и завершённым суицидам. В ходе исследования необходимо тщательно мониторить пациентов

на предмет суицидальных мыслей, в том числе учитывая, что бóльшая часть исследований проводится с участием амбулаторных пациентах. Также может потребоваться контроль побочных эффектов, связанных с другими психическими нарушениями (например, депрессии, мании, настроения).

Тревожные расстройства, коморбидные с другими тревожными или депрессивными расстройствами, связаны с худшими результатами лечения, большей степенью тяжести и хроническим течением [16, 17], бóльшим нарушением функционирования [18], поэтому это необходимо учитывать при включении пациентов в исследование и при долгосрочной оценке эффективности и безопасности лечения.

*Нежелательные реакции со стороны крови.* Особое внимание следует уделить возникновению агранулоцитоза, апластической анемии и тромбоцитопении.

*Нежелательные реакции со стороны сердечно-сосудистой системы.* Необходимо наблюдать за возникновением аритмий и иных различных нарушений проводимости, например удлинением интервала QT, при условии, что лекарственный препарат относится к классу препаратов, оказывающих влияние на сердечно-сосудистую систему, или в исследованиях, в которых используются активные препараты сравнения с такими профилями (например, кломипрамин).

*Нежелательные реакции со стороны эндокринной системы.* Повышенное внимание следует уделять возникновению сексуальных нарушений, либидо и увеличению веса. В зависимости от фармакологических свойств нового лекарственного средства может потребоваться исследование

эндокринологических параметров (например, синдром неадекватной секреции антидиуретического гормона, секреции пролактина).

Метод предметного анализа и сопоставления положений национального и международного нормативного и правового регулирования обращения лекарственных средств в действующей редакции (осуществлялся выборочный анализ положений о подходах к доклиническому и клиническому изучению лекарственных препаратов) показал, что положения руководства ЕМА полностью соответствуют нормативно-правовым актам, действующим в Российской Федерации, предъявляемым при клинических исследованиях лекарственных препаратов, в том числе при разработке оригинальных препаратов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ Руководства Европейского агентства по лекарственным средствам по разработке лекарственных препаратов для терапии генерализованного тревожного расстройства показал, что представленные в данном документе требования могут быть положены в основу разработки отечественного руководства. При этом следует помнить о необходимости соответствия всех исследований, проводимых с целью дальнейшей регистрации новых лекарственных препаратов на территории ЕАЭС, действующему законодательству Российской Федерации и ЕАЭС, а данное руководство соответствует этим требованиям. Это позволит обеспечить получение качественных данных об эффективности и безопасности разрабатываемых отечественных препаратов для лечения генерализованного тревожного расстройства и ускорит их внедрение в медицинскую практику.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Залуцкая НМ. Генерализованное тревожное расстройство: современные теоретические модели и подходы к диагностике и терапии. Часть 1. *Обзор психиатрии и медицинской психологии им. В.М. Бехтерева*. 2014;(3):80–9. Zalutskaya NM. Generalized anxiety disorder: current theoretical models and approaches to diagnosis and therapy. Part 1. *V.M. Bekhterev Review of Psychiatry and Medical Psychology*. 2014;(3):80–9 (In Russ.). EDN: [TBZSND](#)
2. Караваева ТА, Коцюбинский АП. *Холистическая диагностика пограничных психических расстройств*. СПб.: Спецлит; 2017. Karavaeva TA, Kotsyubinskiy AP. *Holistic diagnosis of borderline mental disorders*. St Petersburg: Spetslit; 2017 (In Russ.). EDN: [VTIXZS](#)
3. Bandelow B, Michaelis S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin Neurosci*. 2015;17(3):327–35. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2015.17.3/bbandelow>
4. Lijster JM, Dierckx B, Utens EM, Verhulst FC, Zieldorff C, Dieleman GC, Legerstee JS. The age of onset of anxiety disorders. *Can J Psychiatry*. 2017;62(4):37–46. <https://doi.org/10.1177/0706743716640757>
5. Weisberg RB. Overview of generalized anxiety disorder: epidemiology, presentation, and course. *J Clin Psychiatry*. 2009;70 Suppl 2:4–9. PMID: 19371500
6. Stein DJ, Scott KM, de Jonge P, Kessler RC. Epidemiology of anxiety disorders: from surveys to nosology and back. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017;19(2):127–36. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/dstein>
7. Мартынихин ИА. Гендерные различия эпидемиологии и патогенеза депрессивных и тревожных расстройств в контексте их влияния на эффективность терапии сертралином (Золофтом). *Психиатрия и психофармакотерапия*. 2019;21(3):52–8. Martynikhin IA. Gender differences in the epidemiology and pathogenesis of depressive and anxiety disorders in the context effectiveness of sertraline (Zoloft). *Psychiatry and Psychopharmacotherapy*. 2019;21(3):52–8 (In Russ.). EDN: [XBOAQQ](#)

8. Залуцкая НМ. Генерализованное тревожное расстройство: современные теоретические модели и подходы к диагностике и к терапии. Часть 2. *Обзор психиатрии и медицинской психологии им. В.М. Бехтерева*. 2014;(4):129–34. Zalutskaya NM. Generalized anxiety disorder: current theoretical models and approaches to diagnosis and therapy. Part 2. *V.M. Bekhterev Review of Psychiatry and Medical Psychology*. 2014;(4):129–34 (In Russ.). EDN: [TQUTSH](https://doi.org/10.31887/dcns.2017.19.2/dnut)
9. Maron E, Nutt D. Biological markers of generalized anxiety disorder. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017;19(2):147–58. <https://doi.org/10.31887/dcns.2017.19.2/dnut>
10. Бобров АЕ, Файзрахманова ЕВ. Клинические, личностные и когнитивно-стилевые особенности больных с тревожными расстройствами. *Российский психиатрический журнал*. 2017;(5):50–8. Bobrov AE, Fayzakhmanova EV. Clinical features, personality and cognitive-style characteristics of patients with anxiety disorders. *Russian Journal of Psychiatry*. 2017;(5):50–8 (In Russ.). EDN: [ZOGABN](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0_19)
11. Bandelow B. Current and novel psychopharmacological drugs for anxiety disorders. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1191:347–65. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0\\_19](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0_19)
12. Cuijpers P, Sijbrandij M, Koole SL, Andersson G, Beekman AT, Reynolds CF. The efficacy of psychotherapy and pharmacotherapy in treating depressive and anxiety disorders: a meta-analysis of direct comparisons. *World Psychiatry*. 2013;12(2):137–48. <https://doi.org/10.1002/wps.20038>
13. Erickson SR, Guthrie S, Vanetten-Lee M, Himle J, Hoffman J, Santos SF, et al. Severity of anxiety and work-related outcomes of patients with anxiety disorders. *Depress Anxiety*. 2009;26(12):1165–71. <https://doi.org/10.1002/da.20624>
14. Nepon J, Belik SL, Bolton J, Sareen J. The relationship between anxiety disorders and suicide attempts: findings from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Depress Anxiety*. 2010;27(9):791–8. <https://doi.org/10.1002/da.20674>
15. Cogle JR, Keough ME, Riccardi CJ, Sachs-Ericsson N. Anxiety disorders and suicidality in the National Comorbidity Survey-Replication. *J Psychiatr Res*. 2009;43(9):825–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2008.12.004>
16. Pfeiffer PN, Ganoczy D, Ilgen M, Zivin K, Valenstein M. Comorbid anxiety as a suicide risk factor among depressed veterans. *Depress Anxiety*. 2009;26(8):752–7. <https://doi.org/10.1002/da.20583>
17. Hofmeijer-Sevink MK, Batelaan NM, van Megen HJ, Penninx BW, Cath DC, van den Hout MA, van Balkom A. Clinical relevance of comorbidity in anxiety disorders: a report from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *J Affect Disord*. 2012;137(1–3):106–12. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.12.008>
18. Mackenzie CS, Reynolds K, Cairney J, Streiner DL, Sareen J. Disorder-specific mental health service use for mood and anxiety disorders: associations with age, sex, and psychiatric comorbidity. *Depress Anxiety*. 2012;29(3):234–42. <https://doi.org/10.1002/da.20911>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.П. Соловьева — идея работы, сбор и систематизация данных, анализ и обобщение данных литературы, оформление, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; И.М. Сурмило — сбор и систематизация данных, анализ и обобщение данных литературы, редактирование и переработка рукописи.

**Authors' contributions.** All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Anna P. Solovyova* conceived the study idea, collected and collated data, analysed and summarised literature data, designed the manuscript, and approved the final version for publication. *Irina M. Surmilo* collected and collated data, analysed and summarised literature data, edited and revised the manuscript.

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Соловьева Анна Петровна**, канд. мед. наук / **Anna P. Solovyova**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9244-8934>

**Сурмило Ирина Михайловна** / **Irina M. Surmilo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9845-1018>

Поступила 20.12.2023

После доработки 01.04.2024

Принята к публикации 10.04.2024

Received 20 December 2023

Revised 1 April 2024

Accepted 10 April 2024



О.В. Гунар ✉   
Г.М. Булгакова 

## Совершенствование микробиологических методик анализа качества нестерильных лекарственных средств, обладающих антимикробным действием

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

✉ Гунар Ольга Викторовна; [gunar@expmed.ru](mailto:gunar@expmed.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Первым этапом микробиологического анализа лекарственного средства (ЛС) является оценка его антимикробного действия, то есть влияния ЛС на рост аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов. Совершенствование методических инструментов для проведения микробиологического анализа с целью повышения качества получаемых данных остается актуальной задачей.

**ЦЕЛЬ.** Разработка методического подхода к определению микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств, обладающих антимикробным действием, повышение точности и надежности существующих методик микробиологического анализа.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Для исследования использовали нестерильные ЛС 12 наименований, 5 разбавителей (фосфатный буферный раствор, фосфатный буферный раствор с добавкой полисорбата-80 (1 или 5%), нейтрализующая жидкость, триптиказо-соевый бульон), питательные среды и тест-микроорганизмы, регламентированные Государственной фармакопеей Российской Федерации и Фармакопеей Евразийского экономического союза для проведения микробиологического анализа качества.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Определены условия проведения микробиологического исследования нестерильных ЛС с выявленным антимикробным действием, разработанные методики апробированы на ЛС 10 наименований. Доказана применимость методик количественного определения микроскопических грибов в образцах с фунгистатическим действием. Коэффициенты прорастания *Candida albicans* и *Aspergillus brasiliensis* находились в допустимом диапазоне 76–128%. Предложено внесение изменений в методику качественного определения *Escherichia coli*: разведение образца 1:50 в количестве 50 мл (соответствующее 1 г ЛС), которое вносили в 450 мл соответствующей питательной среды. Сравнение разбавителей, содержащих в составе неспецифические инактиваторы антимикробного действия, показало, что предпочтительным является использование нейтрализующей жидкости.

**ВЫВОДЫ.** Предложен методический подход к определению микробиологической чистоты ЛС, основанный на том, что результаты анализа следует считать достоверными только с учетом антимикробного действия испытуемого образца. Доказана целесообразность увеличения количества образца до 10 мл из разведения, в котором антимикробное действие отсутствует (например, 1:100). Для посева рекомендовано использовать чашки Петри диаметром 150 мм, 50 мл агаризованной питательной среды, а также разбавители, содержащие в составе до 5% полисорбата-80. Показана применимость разведения, при котором антимикробное действие отсутствует; необходимость увеличения количества образца пропорционально вносимому в питательную среду до регламентированного фармакопеей количества — не меньше 1 г (мл), а также рекомендовано использовать разбавители, содержащие в составе до 5% полисорбата-80, для инактивации бактериостатического и фунгистатического действия.

**Ключевые слова:** нестерильные лекарственные средства; качество лекарственных средств; микробиологическая чистота; антимикробное действие; контроль качества; методы микробиологического анализа

**Для цитирования:** Гунар О.В., Булгакова Г.М. Совершенствование микробиологических методик анализа качества нестерильных лекарственных средств, обладающих антимикробным действием. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):362–369. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-362-369>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0).

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Olga V. Gunar  ,  
Galina M. Bulgakova  

## Improvement of Microbiological Methods for Testing the Quality of Non-sterile Medicines with Antimicrobial Effects

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

 **Olga V. Gunar;** [gunar@expmed.ru](mailto:gunar@expmed.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Microbiological testing of any medicine begins with the determination of its antimicrobial activity—that is, its effect on the growth of aerobic bacteria, yeasts, and moulds. Therefore, the improvement of microbiological testing methods to enhance the quality of resulting data remains a high priority.

**AIM.** The study aimed to develop a methodological approach to testing non-sterile medicines with antimicrobial effects for microbiological quality, as well as to improve the accuracy and reliability of existing microbiological testing methods.

**MATERIALS AND METHODS.** The study used 12 non-sterile pharmaceuticals, 5 diluents (phosphate buffer solution, phosphate buffer solution with polysorbate 80 (1% and 5%), neutralising fluid, and trypticase soy broth), culture media, and test strains required for microbiological quality testing according to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation and the Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union.

**RESULTS.** This study established microbiological testing conditions for non-sterile medicines with known antimicrobial effects. The analytical procedures developed in the study were tested on 10 medicines. The authors demonstrated the applicability of analytical procedures for the quantitative determination of microscopic fungi in samples with fungistatic activity. The proliferation factors in growth promotion tests with *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis* were within the acceptable range of 76–128% of the calculated value for a standardised inoculum. The authors proposed a modification to the analytical procedure for the qualitative determination of *Escherichia coli*; the modification involved using a 50 mL sample at a 1:50 dilution, corresponding to 1 g of the test product, for transfer to 450 mL of an appropriate culture medium. Having compared diluents containing non-specific agents neutralising antimicrobial activity, the authors showed that the neutralising fluid should be preferred.

**CONCLUSIONS.** The authors proposed a methodological approach to microbiological quality testing of medicines, postulating that the results should be considered reliable only if they account for the antimicrobial activity of the test product. The study demonstrated the feasibility of increasing the sample volume up to 10 mL and using a dilution exhibiting no antimicrobial activity (e.g., 1:100). The authors recommended using 150 mm Petri dishes, 50 mL of an agarised culture medium, and diluents with up to 5% of polysorbate 80 for plating. The study demonstrated the suitability of using a dilution exhibiting no antimicrobial activity. The study results indicated the need to increase the sample volume to be proportionally transferred to a culture medium; the sample should contain the amount of the test product regulated by pharmacopoeias (i.e., not less than 1 g (1 mL)). Diluents with up to 5% of polysorbate 80 were recommended for neutralising bacteriostatic and fungistatic effects.

**Keywords:** non-sterile medicines; quality; microbiological quality; antimicrobial effect, quality control; microbiological testing procedures

**For citation:** Gunar O.V., Bulgakova G.M. Improvement of microbiological methods for testing the quality of non-sterile medicines with antimicrobial effects. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):362–369. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-362-369>

**Funding.** The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00026-24-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D reporting No. 124022300127-0).

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Инциденты, связанные с контаминацией лекарственных средств (ЛС) микроорганизмами, были зафиксированы еще в 60-х годах XX века и, к сожалению, продолжают до наших дней<sup>1</sup>, что требует от производителей фармацевтической продукции, экспертов и представителей контрольных органов особого внимания к микробиологическому качеству ЛС. В 2024 г. в Федеральный закон Российской Федерации «Об обращении лекарственных средств» были внесены изменения, согласно которым была обозначена необходимость определения микробиологических характеристик лекарственных средств, в том числе фармацевтических субстанций<sup>2</sup>.

Методики оценки микробиологических показателей качества ЛС (стерильность и микробиологическая чистота) утверждены в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) и Фармакопее Евразийского экономического союза (ФЕАЭС)<sup>3</sup>, микробиологические методики для анализа конкретных лекарственных препаратов (ЛП) в случае необходимости описываются в нормативной документации и, как правило, обосновываются валидационными (верификационными) исследованиями, представленными в регистрационных досье на ЛП. В соответствии с положениями фармакопей<sup>4</sup> первым этапом испытания ЛС, в том числе высокотехнологичных лекарственных препаратов, по показателям «Стерильность» или «Микробиологическая чистота» является оценка влияния непосредственно ЛП на рост минимального количества определенных микроорганизмов с целью доказательства применимости методики анализа. Выявленное влияние определяется как антимикробное действие ЛС, которое может быть одной из основных

возможных причин получения ложноотрицательных результатов анализа качества ЛС [1] и отражает особенности используемых субстанций, вспомогательных веществ, а также технологический процесс производства [2].

Ранее вопросы, связанные с изучением антибактериального и противогрибкового действия ЛС и с различными способами его нейтрализации, уже обсуждались [3, 4], однако в связи с развитием фармацевтической микробиологии необходимы пересмотр и модификация методик анализа с целью повышения точности и достоверности результатов анализа.

Цель работы – разработка методического подхода к определению микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств, обладающих антимикробным действием, повышение точности и надежности существующих методик микробиологического анализа.

Задачи исследования:

- определение антимикробного действия некоторых ЛС;
- определение подходов к совершенствованию испытания в отношении содержания аэробных микроорганизмов и дрожжевых и плесневых грибов и модификация условий методик определения микробиологического качества;
- модификация методики выделения *Escherichia coli* из ЛС, обладающих антибактериальным действием в отношении указанного микроорганизма;
- оценка применимости различных разбавителей ЛС в качестве неспецифических инaktivаторов для нейтрализации антимикробного действия.

<sup>1</sup> Чисто неслучайно: проблема контаминации при производстве лекарств. GxP News, 05.02.2024. <https://gxpnews.net/2024/02/chisto-ne-sluchajno-problema-kontaminaczii-pri-proizvodstve-lekarstv/>

<sup>2</sup> Федеральный закон Российской Федерации от 30.01.2024 № 1-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон “Об обращении лекарственных средств” и статьи 1 и 4 Федерального закона “О внесении изменений в Федеральный закон “Об обращении лекарственных средств” и Федеральный закон “О внесении изменений в Федеральный закон “Об обращении лекарственных средств”»».

<sup>3</sup> ОФС.1.2.4.0002.18. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

Фармакопея ЕАЭС 2.1.6.6. Микробиологические испытания нестерильных лекарственных средств: общее количество аэробных микроорганизмов. М.; 2020.

<sup>4</sup> Там же.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Лекарственные средства.** В работе использовали ЛС 12 международных непатентованных наименований: безопрокт, мазь для ректального и наружного применения; протаргол (серебра протеинат), порошок для приготовления раствора для местного применения; вегадерм, мазь для наружного применения 0,5+1,0+10,0 мг/г (бетаметазон+гентамицин+клотримазол); уксусная кислота, субстанция-раствор; формагель, гель для наружного применения 3,7%; амлодипин, таблетки 10 мг; хлоропирамин, таблетки 25 мг; дротаверина гидрохлорид, субстанция-порошок; альфа-липоевая кислота, субстанция-порошок; периндоприл+амлодипин 10 мг+10 мг, таблетки; эстриол, крем вагинальный 1 мг/г; итраконазол, капсулы 100 мг.

**Тест-штаммы микроорганизмов.** *Escherichia coli* ATCC 8739; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Candida albicans* ATCC 10231; *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

В работе использовали микробиологические питательные среды, в том числе триптиказо-соевый агар (TSA); агар Сабуро (SDCA); триптиказо-соевый бульон (TSB); маннитно-солевой агар; цетримидный агар; агар Эндо-ГРМ для выявления энтеробактерий; разбавители: раствор натрия хлорида 0,9%<sup>5</sup>, фосфатный буферный раствор с натрия хлоридом и пептоном (рН 7,0) (ФБР)<sup>6</sup> с полисорбатом-80 (1 или 5%), нейтрализующая жидкость<sup>7</sup>.

**Используемое оборудование.** Инкубаторы BD-240 и KB-115 (Binder); ламинарный шкаф (Labconco); счетчик колоний Scan 100 (Interscience); микроскоп стереоскопический Olympus BX41; весы лабораторные электронные Сартогосм SE 623-С (ООО «Сартогосм»).

**Методы исследования.** Экспериментальное исследование проводили по методикам определения антимикробного действия и микробиологической чистоты, указанным в ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» ГФ РФ XIV изд., ОФС 2.1.6.6 «Микробиологические испытания нестерильных лекарственных средств: общее количество аэробных микроорганизмов» Фармакопеи ЕАЭС.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрим случай, когда установленное противогрибковое действие нестерильных ЛС нейтрализуется дополнительным разведением образца в 100 раз, а применять такое разведение для посева 1 мл в стандартные чашки Петри диаметром 90 мм нецелесообразно, так как нормативные требования в отношении количества дрожжевых и плесневых грибов составляют не более 10 КОЕ/г (мл).

Для получения достоверного значения содержания дрожжевых и плесневых грибов использовали стерильные чашки Петри увеличенного размера (150 мм в диаметре), в каждую из которых вносили по 10 мл образца из разведения 1:100, что по количеству анализируемого вещества соответствовало стандартному объему 1 мл из разведения 1:10. Дополнительное разведение 1:100 нейтрализовало выявленное противогрибковое действие рассматриваемых ЛС, а внесение в каждую чашку Петри по 10 мл образца позволило получить достоверный результат, соответствующий в пересчете 1 г ЛС. Согласно методике испытания для роста возможных грибов-контаминантов использовали агар Сабуро в количестве 50 мл на каждую чашку Петри при посеве, а затем выполняли инкубацию в стандартных условиях.

На основании полученных значений количества дрожжеподобных и плесневых грибов рассчитывали коэффициенты прорастания микроорганизмов ( $K_{np}$ ) по формуле (1) (табл. 1). Коэффициенты прорастания *Candida albicans* составляли 76–101%, *Aspergillus brasiliensis* – 82–128%, что является допустимым согласно ФЕАЭС<sup>8</sup>.

$$K_{np} = \frac{N}{N_0}, \quad (1)$$

где  $N$  и  $N_0$  – средние арифметические числа колоний на чашках Петри с исследуемым и с контрольным образцом соответственно.

Рассмотренный в настоящем исследовании подход может быть реализован в тех случаях, когда антибактериальное действие ЛС сохраняется в разведении 1:1000 при допустимом пределе содержания аэробных микроорганизмов 1000 КОЕ/г. При отсутствии роста после внесения 10 мл из разведения 1:10000 на чашку

<sup>5</sup> ОФС.1.2.4.0002.18. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

<sup>6</sup> Там же.

<sup>7</sup> Фармакопея ЕАЭС 2.1.6.6. Микробиологические испытания нестерильных лекарственных средств: общее количество аэробных микроорганизмов. М.; 2020.

<sup>8</sup> Там же.

**Таблица 1.** Результаты оценки фунгистатического действия лекарственных препаратов**Table 1.** Results of assessing the fungistatic activity of medicines

Наименование лекарственного средства <i>Medicine name</i>	Разведение <i>Dilution</i>	Количество выявленных микроорганизмов (КОЕ/г) <i>Number of micro-organisms detected (CFU/g)</i>					
		<i>Candida albicans</i>			<i>Aspergillus brasiliensis</i>		
		I	II	III	I	II	III
Безопрокт, мазь <i>Bezoproct, ointment</i>	1:10	–	–	99±4 $K_{np}$ 101%	–	–	75±2 $K_{np}$ 110%
	1:100	+	+		+	+	
Протаргол (серебра протеинат), порошок <i>Protargol (silver proteinate), powder</i>	1:10	–	–	89±6 $K_{np}$ 91%	–	–	87±3 $K_{np}$ 128%
	1:100	+	+		+	+	
Вегадерм, мазь <i>Vegaderm, ointment</i>	1:10	–	–	88±1 $K_{np}$ 90%	–	–	63±2 $K_{np}$ 93%
	1:100	+	+		+	+	
Уксусная кислота, субстанция-раствор <i>Acetic acid, active substance, solution</i>	1:10	–	–	76±4 $K_{np}$ 76%	–	–	65±1 $K_{np}$ 96%
	1:100	+	+		+	+	
Формагель, гель <i>Formagel, gel</i>	1:10	–	–	84±6 $K_{np}$ 86%	–	–	56±6 $K_{np}$ 82%
	1:100	+	+		+	+	
Контроль роста тест-микроорганизма <i>Test strain growth control</i>	не применимо <i>not applicable</i>	+	+	98±2	+	+	68±1

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** «–» – 0%, рост отсутствовал; «+» – 100%, рост, аналогичный росту тест-микроорганизмов по количеству и морфологии колоний;  $K_{np}$  – коэффициент прорастания микроорганизмов.

I – метод определения антимикробного действия в условиях определения микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств (ОФС.1.2.4.0002.18 Государственная фармакопея Российской Федерации, изд. XIV); II – метод репликаций; III – количественный метод, предложенный авторами статьи;

**Note.** –, no growth (0%); +, growth similar in the number and morphology of colonies to that of test strains (100%);  $K_{np}$ , proliferation factor from growth promotion tests.

I: method for determining antimicrobial activity in microbiological quality testing of non-sterile medicines (OFS.1.2.4.0002.18, State Pharmacopoeia of the Russian Federation, ed. XIV); II: method for determining the antimicrobial activity of water-insoluble medicines (method of replications); III: quantitative method proposed by the authors.

Петри диаметром 150 мм можно дать заключение следующего содержания: в 1 г испытуемого ЛС – менее 1000 КОЕ микроорганизмов, что соответствует требуемым нормативам.

В некоторых случаях при оценке показателя «Микробиологическая чистота», согласно нормативным требованиям<sup>9</sup>, необходимо установить отсутствие *E. coli* в образце ЛС. Этот микроорганизм, относящийся к семейству энтеробактерий, является санитарно-показательным, может служить критерием соблюдения правил надлежащей производственной практики при фармацевтическом производстве. *E. coli* необходимо выделять:

- из твердых (неводных) и жидких препаратов для приема внутрь (категория 3А);
- из ЛП природного происхождения, уровень микробной загрязненности которого

невозможно снизить в процессе предварительной обработки (категория 3Б);

- из готовых смесей для лечебных кормов, применяемых в ветеринарии, с использованием наполнителей природного происхождения, для которых противомикробная обработка невозможна (категория 3В);
- из фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ синтетического и природного происхождения для производства нестерильных ЛП (категории 3.2 и 2.2).

Оценка микробиологического качества ЛС, обладающих антимикробным действием в отношении *E. coli*, затруднена. Для решения этой задачи нами был предложен подход, состоящий в нейтрализации антимикробного действия препарата путем увеличения объема анализируемого образца ЛС до 50 мл в разведении 1:50,

<sup>9</sup> ОФС.1.2.4.0002.18. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

Фармакопея ЕАЭС 2.1.6.6. Микробиологические испытания нестерильных лекарственных средств: общее количество аэробных микроорганизмов. М.; 2020

при котором нейтрализуется антимикробное действие. Увеличенный объем (50 мл) образца лекарственного препарата вносили в 450 мл питательной среды (триптиказо-соевого бульона). Результаты, полученные при апробации данной методики на примере пяти ЛС (амлодипин, таблетки; периндоприл+амлодипин, таблетки; хлоропирамин, таблетки; дротаверин, субстанция; липоевая кислота, субстанция), обобщены в *таблице 2* и демонстрируют целесообразность увеличения объема разведения образца (например, до 50 или 100 мл) и объема питательной среды (до 450 или 900 мл) пропорционально количеству образца, которое должно составлять не менее 1 г (мл). Условия методик определения микробиологического качества лекарственных средств, обладающих и не обладающих антимикробным действием, приведены в *таблице 3*.

Нами было проведено сравнение пяти различных разбавителей с целью оценки их применимости в качестве неспецифических инактиваторов для нейтрализации антимикробного действия. Так, для нейтрализации бактериостатического действия экстраиола, крем вагинальный, и фунгистатического действия итраконазола, капсулы 100 мг, были апробированы два разбавителя без инактиваторов (ФБР и TSB) и три разбавителя,

содержащие в составе неспецифические инактиваторы: полисорбат-80 (1 или 5%), яичный (или соевый) лецитин (0,3% в составе нейтрализующей жидкости), гистидина гидрохлорид (0,1% в составе нейтрализующей жидкости). Полученные результаты представлены в *таблице 4* «Результаты нейтрализации антимикробного действия лекарственных препаратов эстриол, крем вагинальный, и итраконазол, капсулы 100 мг, с использованием различных разбавителей», опубликованной на сайте журнала<sup>10</sup>.

Разведения от 1:10 до 1:50 препарата эстриол, крем вагинальный, в ФБР, ФБР с 1% полисорбатом-80 и TSB не могут быть применены для выявления грамположительных (*B. subtilis* и *S. aureus*) и грамотрицательных (*E. coli*) бактерий.  $K_{np}$  составляет 0–48%. При добавлении в разбавитель полисорбата-80 в количестве 5% или применении нейтрализующей жидкости, в состав которой согласно нормативным актам<sup>11</sup> входит 3% полисорбата-80,  $K_{np}$  возрастает до 88%. Применение разбавителя, содержащего 1 или 5% полисорбата-80, для нейтрализации противогрибкового действия итраконазола, капсул, положительно сказывается на  $K_{np}$  дрожжевых и плесневых грибов. Использование фосфатного буферного раствора и триптиказо-соевого бульона в качестве разбавителя не позволяет выявить *A. brasiliensis*.

**Таблица 2.** Нейтрализация бактериостатического действия лекарственного препарата в отношении *Escherichia coli* различными методами

**Table 2.** Neutralisation of the bacteriostatic activity of medicines against *Escherichia coli* by various methods

Наименование лекарственного средства <i>Medicine name</i>	Разведение <i>Dilution</i>	Методики нейтрализации <i>Neutralisation methods</i>		
		I	II	III
Амлодипин, таблетки Хлоропирамин, таблетки Дротаверин, субстанция Липоевая кислота, субстанция Периндоприл+амлодипин, таблетки <i>Amlodipine, tablets</i> <i>Chloropyramine, tablets</i> <i>Drotaverine, active substance</i> <i>Lipoic acid, active substance</i> <i>Perindopril+amlodipine, tablets</i>	1:10	–	–	50 мл из разведения 1:50 вносили в 450 мл соответствующей питательной среды <i>50 mL of a 1:50 dilution was transferred to 450 mL of an appropriate culture medium</i>
	1:50	+	+	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** «–» – рост отсутствовал, «+» – рост, аналогичный росту тест-микроорганизма в жидкой питательной среде, I – метод определения антимикробного действия в условиях определения микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств (ОФС.1.2.4.0002.18 Государственная фармакопея Российской Федерации, изд. XIV); II – метод репликаций; III – качественный метод, предложенный авторами статьи.

**Note.** –, no growth; +, growth similar to that of the test strain in a liquid culture medium.

I: method for determining antimicrobial activity in microbiological quality testing of non-sterile medicines (OFS.1.2.4.0002.18, State Pharmacopoeia of the Russian Federation, ed. XIV); II: method for determining the antimicrobial activity of water-insoluble medicines (method of replications); III: quantitative method proposed by the authors.

<sup>10</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-362-369-tabl>

<sup>11</sup> Там же.

**Таблица 3.** Условия микробиологических методик количественного и качественного определения микроорганизмов в лекарственных средствах

**Table 3.** Conditions for microbiological analytical procedures for the quantitative and qualitative determination of micro-organisms in medicines

Условия методики <i>Analytical conditions</i>	Антимикробное действие лекарственного средства <i>Antimicrobial activity</i>	
	Присутствует <i>Present</i>	Отсутствует <i>Absent</i>
<b>Количественное определение аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов</b> <i>Quantitative determination of aerobic micro-organisms, yeasts, and moulds</i>		
Минимальное разведение образца <i>Minimum sample dilution</i>	1:10	1:50
Минимальный объем образца, вносимый в чашку Петри, мл <i>Minimum volume of a sample added to a Petri dish, mL</i>	1	10
Диаметр используемых чашек Петри, мм <i>Petri dish diameter, mm</i>	90	150
Количество питательной среды, вносимой в чашку Петри, мл <i>Volume of a culture medium added to a Petri dish, mL</i>	10	50
<b>Качественное определение отдельных видов бактерий (например, <i>Escherichia coli</i>)</b> <i>Qualitative determination of specified micro-organisms (e.g. Escherichia coli)</i>		
Минимальное разведение образца <i>Minimum sample dilution</i>	1:10	1:50
Минимальный объем образца, вносимый в жидкую питательную среду, мл <i>Minimum volume of a sample added to a liquid culture medium, mL</i>	10	50
Объем питательной среды, мл <i>Volume of a culture medium, mL</i>	90	450

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

## ВЫВОДЫ

1. Предложен методический подход к определению микробиологической чистоты ЛС, основанный на том, что результаты определения анализа следует считать достоверными только с учетом антимикробного действия испытуемого образца.  
2. На примере различных лекарственных форм (мазь, гель, порошок и др.), обладающих антимикробным действием в минимально возможном разведении (1:10), показана целесообразность увеличения количества образца до 10 мл из разведения, в котором антимикробное действие отсутствует (1:50). Для посева рекомендовано использовать чашки Петри диаметром 150 мм

и 50 мл соответствующей агаризованной питательной среды.

3. Показана применимость следующих условий оценки микробиологической чистоты:

- использование разведения, при котором антимикробное действие отсутствует;
- увеличение количества образца пропорционально вносимому в питательную среду до регламентированного фармакопеями количества – не меньше 1 г (мл).

4. Рекомендовано использование разбавителей, содержащих в составе до 5% полисорбата-80, для инактивации бактериостатического и фунгистатического действия.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Буйлова ИА, Сахно НГ, Булгакова ГМ, Гунар ОВ. Исключение ложных результатов микробиологического анализа лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2018;8(3):187–92.  
Buylova IA, Sakhno NG, Bulgakova GM, Gunar OV. Elimination of false results of medicines microbiological testing. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2018;8(3):187–92.

tion. 2018;8(3):187–92 (In Russ.).

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-187-192>

2. Каменская ЮВ. Антимикробное действие растительных экстрактов. *Наука, образование и культура.* 2019;(7):31–2.  
Kamenskaya YuV. Antimicrobial activity of plant extracts. *Science, Education and Culture.* 2019;(7):31–2 (In Russ.). EDN: KZYLYI
3. Буйлова ИА, Гунар ОВ. Применение поверхностно-активных веществ (ПАВ) при контроле качества лекарственных средств по микробиологическим

показателям. *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(3):58–61.

<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2021-55-3-58-61>

Builova IA, Gunar OV. Use of surfactants in quality control of solid dosage forms with respect to microbiological indicators. *Pharm Chem J*. 2021;55(3):308–11.

<https://doi.org/10.1007/s11094-021-02417-w>

4. Гунар ОВ, Сахно НГ. Микробиологическая безопасность лекарственных препаратов, содержащих этиловый спирт. *Биозащита и биобезопасность*. 2011;3(2):44–8.

Gunar OV, Sakhno NG. Microbiological safety of medicinal products containing ethyl alcohol. *Biosecurity and Biosafety*. 2011;3(2):44–8 (In Russ.).

EDN: [OQRBCJ](https://orcid.org/0000-0002-4825-8356)

**Дополнительная информация.** Таблица 4 размещена на сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств».

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-362-369-tabl>

**Вклад авторов.** Авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Г.М. Булгакова – экспериментальное выполнение исследования, участие в обсуждении результатов и редактировании текста рукописи; О.В. Гунар – идея выполнения исследования, участие в обсуждении результатов, написание и редактирование текста рукописи.

**Additional information.** Table 4 is posted on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-362-369-tabl>

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Galina M. Bulgakova* conducted experiments, participated in the discussion of the study results and editing of the manuscript. *Olga V. Gunar* conceived the idea of the study and participated in the discussion of the study results and drafting and editing of the manuscript.

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Гунар Ольга Викторовна, д-р фарм. наук / **Olga V. Gunar**, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4825-8356>

Булгакова Галина Михайловна / **Galina M. Bulgakova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6474-4795>

Поступила 19.02.2024

После доработки 11.04.2024

Принята к публикации 18.06.2024

Received 19 February 2024

Revised 11 April 2024

Accepted 18 June 2024



О.А. Ваганова    
А.А. Натыкан  

## Рекомендации по оформлению раздела нормативной документации на лекарственные средства: вода (определение методом Фишера)

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

✉ Ваганова Ольга Александровна; [vaganova@expmed.ru](mailto:vaganova@expmed.ru)

### РЕЗЮМЕ

Предложены рекомендации по изложению в нормативном документе (нормативной документации) методики оценки качества лекарственных средств по показателю «Определение воды» при использовании метода К. Фишера. Рассмотрены особенности проведения анализа и учета результатов, предложена типовая схема редакционного оформления раздела. Унификация изложения и оформления текста нормативной документации позволит безошибочно выполнять испытание, получать достоверный результат и упростит экспертизу лекарственных средств.

**Ключевые слова:** метод Фишера; качество лекарственных средств; нормативный документ; определение воды

**Для цитирования:** Ваганова О.А., Натыкан А.А. Рекомендации по оформлению раздела нормативной документации на лекарственные средства: вода (определение методом Фишера). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):370–372. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-370-372>

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Olga A. Vaganova    
Alexey A. Natykan  

## Recommendations for the Content of a Product Specification File: Water (Karl Fischer Method)

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

✉ Olga A. Vaganova; [vaganova@expmed.ru](mailto:vaganova@expmed.ru)

### ABSTRACT

This article provides recommendations for documenting an analytical procedure for water determination by Karl Fischer titration in a product specification file (PSF). The article contains a description of specific aspects associated with the test and a template for the typical content and layout of the corresponding PSF section. A unified approach to the PSF content and layout will ensure error-free testing, reliable results, and streamlined regulatory assessments.

**Keywords:** Karl Fischer method; quality of medicinal products; product specification file; water

**For citation:** Vaganova O.A., Natykan A.A. Recommendations for the content of a product specification file: water (Karl Fischer method). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):370–372. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-370-372>

**Funding.** The study was performed without external funding.

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

© О.А. Ваганова, А.А. Натыкан, 2024

Определение воды методом К. Фишера регламентировано Государственной фармакопеей Российской Федерации (ГФ РФ) ОФС.1.2.3.0002 «Определение воды» при регистрации лекарственного средства по национальной процедуре и монографиями Фармакопеи Евразийского экономического союза (ЕАЭС) 2.1.5.12. «Вода: определение полумикрометодом» и 2.1.5.13. «Вода: микроопределение» при регистрации в рамках ЕАЭС. В нормативном документе (нормативной документации, НД) при описании методики должна быть представлена необходимая для проведения испытания информация.

По Фармакопее ЕАЭС в отличие от ГФ РФ предусмотрена проверка пригодности либо методом «введено/найдено», либо путем оценки линейности методики в выбранном диапазоне. С точки зрения экспертов данная процедура не подлежит включению в проект НД, поскольку относится к стандартной операционной процедуре для работы на титраторе и не зависит от объекта анализа. Также в проект НД не включают описание процедуры установки титра.

Раздел «Определение воды» должен состоять из следующих подразделов: норма, метод, оборудование и материалы, реактивы, процедура, расчет результата. Нумерация разделов не обязательна, но приветствуется.

Примеры оформления текста нормативной документации на лекарственные средства по разделу «Определение воды» (методом К. Фишера) опубликованы на сайте журнала<sup>1</sup>.

**Норма.** Указывают требование в виде «Не более ... %» или «От ... до ...%».

**Метод.** Указывают ссылку на метод испытания и приводят его краткое описание. Если приводят ссылки одновременно и на Фармакопею ЕАЭС, и на ГФ РФ, то стоит помнить о различии в наименовании методов. Метод А монографии 2.1.5.12. (прямое титрование) соответствует методике Б по ОФС.1.2.3.0002.

**Оборудование и материалы.** В данном подразделе описывают основное оборудование и его комплектацию (если это может повлиять на результат), а также вспомогательное оборудование и необходимые расходные материалы. В случае использования печи обязательно указывают ее настройки. Настройки титратора (скорость подачи титранта, установка конечной точки титрования и т.д.) приводят при необходимости (если при валидации выявлено значимое влияние параметра).

Указание на оборудование необходимо для проверки корректности выбора используемых реактивов и для правильного воспроизведения методики, описанной, в том числе, в валидационной части досье. В практике экспертизы встречались случаи, когда методикой производителя (согласно материалам досье) был предусмотрен кулонометрический титратор с печью, но в проекте НД был указан волюметрический метод, что приводило к запросу об уточнении.

**Реактивы.** В подразделе указывают реактивы, необходимые для испытания. При указании производителя и каталожного номера уточняют возможность использования реактивов аналогичного качества. При наименовании реактива в соответствии с действующим изданием фармакопеи допустимо не указывать квалификацию и производителя.

Важно проверить, чтобы указанные реактивы соответствовали заявленному оборудованию. Так, реактив Фишера для волюметрического титратора не совместим с кулонометрическим титратором. В свою очередь, кулонометрический титратор может иметь ячейку как с диафрагмой, так и без нее в зависимости от модели. Реактивы для одного варианта ячейки не совместимы с другим.

**Процедура.** Подробно описывают все манипуляции, связанные с пробоподготовкой и проведением испытания. Обязательно должно быть указано время перемешивания перед титрованием после добавления образца в ячейку для титрования. Данный параметр должен быть подтвержден валидационно.

При описании процедуры кулонометрического титрования с использованием печи рекомендуется использовать не менее трех пустых запечатанных флаконов для проведения холостого опыта.

При контроле лиофилизатов кулонометрическим методом с печью указанная навеска по возможности должна быть меньше фактической массы содержимого контейнера с лекарственным средством. Если необходимая навеска близка к номинальной массе содержимого, то сбор частиц образца со стенок флакона удлиняет процесс взятия навесок и потенциально ведет к ошибке из-за обводнения образца.

Отдельного внимания требует пробоподготовка для определения воды в лиофилизате, которая может быть проведена либо с экстракцией, либо с растворением образца перед титрованием.

<sup>1</sup> <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-370-372-suppl>

Если при внесении растворителя в контейнер с образцом образец растворяется полностью, то проводят определение с растворением. Если большая часть образца остается не растворена, то проводят определение с экстракцией. Далее определяют содержание воды в полученном растворе (надосадочной жидкости) и рассчитывают ее содержание в испытуемом образце с учетом содержания влаги в исходном растворителе.

Некоторые особенности техники работы с флаконами могут повлиять на результат анализа, поэтому их необходимо учитывать. Для корректного определения масс на разных этапах процедуры взвешивать флакон до добавления растворителя следует после выравнивания давления. Поскольку свободное пространство над лиофилизатом в зависимости от технологии производства препарата может быть заполнено воздухом или инертным газом с давлением ниже атмосферного (плотность воздуха при нормальных условиях  $\approx 1$  мг/мл), то взвешивание без выравнивания давления по сравнению с пустым отмытым флаконом будет иметь погрешность. Выравнивание давления и первое взвешивание рекомендуется проводить до удаления металлической обкатки с пробок.

Отмытые флаконы, как правило, высушивают при 100 °С, однако резиновые пробки следует высушивать при комнатной температуре. При нагреве пробки могут отдавать влагу, содержащуюся в материале, что приведет к завышению определения массы содержимого флакона и, как следствие, к неправильному результату анализа.

Следует внимательно относиться к обозначениям масс, необходимых для расчета результата, и убедиться, что в расшифровке множителей и в формулах указаны соответствующие величины.

**Расчет результата.** При проведении испытания без сложной пробоподготовки (прямое внесение образца в ячейку для титрования или определение с печью) для вычисления результата, как правило, достаточно средств встроеного программного обеспечения автотитратора, и данный раздел может быть пропущен. В случае определения с растворением или с экстракцией образца приводят формулу для расчета результата с расшифровкой множителей. Следует обратить внимание на разницу расчетных формул, используемых для методов с растворением образца и с экстракцией воды из образца.

**Дополнительная информация.** На сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» размещены примеры оформления текста нормативной документации на лекарственные средства по разделу «Определение воды» (методом К. Фишера).

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-370-372-suppl>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.А. Натыкан — концепция работы, написание и оформление текста рукописи; О.А. Ваганова — утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

**Additional information.** A sample template for the product specification file section on water determination (K. Fischer method) is posted on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-370-372-suppl>

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Alexey A. Natykan* elaborated the concept, drafted and formatted the manuscript. *Olga V. Vaganova* approved the final version of the manuscript for publication.

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Ваганова Ольга Александровна**, канд. фарм. наук / **Olga A. Vaganova**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-4443-5441>

**Натыкан Алексей Андреевич**, канд. хим. наук / **Alexey A. Natykan**, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5904-8357>

Поступила 28.03.2024

После доработки 15.05.2024

Принята к публикации 18.06.2024

Received 28 March 2024

Revised 15 May 2024

Accepted 18 June 2024

**Регуляторные исследования  
и экспертиза лекарственных средств**

