

Том 15, № 1
Vol. 15, No. 1
2025

Regulatory research and medicine evaluation

ISSN 3034-3062 (Print)
ISSN 3034-3453 (Online)

Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств



ГЛАВНАЯ ТЕМА

Антибактериальные средства: разработка, контроль качества, антибиотикорезистентность

www.vedomostincsmrp.ru

QR-гид: документы в мгновенном доступе

Нормативно-правовые документы Антибактериальные препараты: разработка, контроль качества, антибиотикорезистентность



Распоряжение Правительства Российской Федерации от 30.03.2019 № 604-р «Об утверждении Плана мероприятий на 2019–2024 годы по реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года, утвержденной Распоряжением Правительства Российской Федерации от 25.09.2017 № 2045-р»



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



Указ Президента Российской Федерации от 07.05.2024 № 309 «О национальных целях развития Российской Федерации на период до 2030 года и на перспективу до 2036 года»



Приказ Федерального медико-биологического агентства от 25.04.2019 № 86 «О реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года в медицинских организациях, подведомственных ФМБА России»



Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18.03.2024 № 127н «Об утверждении стандарта медицинской помощи взрослым при острых респираторных вирусных инфекциях (ОРВИ) (диагностика и лечение)»



Распоряжение Правительства Российской Федерации от 07.06.2023 № 1495-р «Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года»



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



Распоряжение Правительства Российской Федерации от 25.09.2017 № 2045-р «Об утверждении Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации»



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

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/>





Уважаемые читатели!

Одним из приоритетов развития системы здравоохранения является переход к персонализированной, предиктивной, профилактической медицине, что требует создания инновационных, высокоэффективных, качественных лекарственных средств, в первую очередь антибактериальных, которые были и остаются важнейшим инструментом борьбы с инфекционными заболеваниями. Однако их неконтролируемое использование привело к тому, что многие бактерии стали устойчивыми к этим препаратам.

Проблема антибиотикорезистентности стала наиболее актуальной и тревожной в XXI веке — получили широкое распространение штаммы микроорганизмов, характеризующиеся устойчивостью к большинству антимикробных препаратов. Рост полирезистентных штаммов, характерных для нозокомиальной инфекции, грамположительных и грамотрицательных бактерий, связан с расширением возможности оказания медицинской помощи пациентам в критическом состоянии, пациентам различных возрастных групп с тяжелой коморбидной патологией. Широкое применение антибиотиков с лечебной и профилактической целью привело к селекции и распространению полирезистентной флоры, в то время как число антибактериальных препаратов, преодолевающих резистентность, постоянно снижается. Все это вызывает серьезные опасения у медицинского сообщества.

В данном выпуске журнала представлены статьи, посвященные наиболее актуальным вопросам качества, экспертизы и рационального применения антибактериальных лекарственных средств.

Важным инструментом борьбы с последствиями антибиотикорезистентности является поиск и внедрение в медицинскую практику новых лекарственных средств. Одна из статей журнала посвящена методу моделирования антибиотикорезистентности, используемому при разработке таких препаратов.

Главная причина развития антибиотикорезистентности — нерациональное использование антибактериальных средств. Результаты социального опроса, представленного в выпуске, подтверждают важность проблемы и необходимость поиска способов ее решения.

Вопросы контроля качества лекарственных препаратов актуальны для всех групп лекарственных средств. В выпуске опубликовано описание методики контроля качества антибиотиков группы цефалоспоринов.

Мы надеемся, что материалы этого выпуска помогут лучше понять проблему антибиотикорезистентности и будут способствовать поиску путей ее решения.

*Искренне ваша,
главный редактор*

**Косенко
Валентина Владимировна**

Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств

Рецензируемый научно-практический журнал

Учредитель и издатель:

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

Главный редактор:

Косенко Валентина Владимировна,
канд. фарм. наук

Шеф-редактор:

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

Ответственный редактор:

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

**Ответственный редактор
тематического выпуска:**

Журавлева Марина Владимировна, д-р мед. наук,
проф.

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. 63-42, 63-65)
vedomosti@expmed.ru

Журнал основан в 1999 году.

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

Выходит шесть раз в год.

Журнал открытого доступа, индексируется в российских и междуна-
родных реферативных и индексных базах данных:
Chemical Abstracts (CAS), Embase, Российский индекс научного цитиро-
вания (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 ЛАНБ, Research4life, Lens.org, Openaire.eu,
Ulrichsweb, Mendeley, Unpaywall, OpenCitations и др.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ — 0,571.

Входит в «Белый список» научных журналов, в Перечень рецензируе-
мых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные
научные результаты диссертаций на соискание ученой степени канди-
дата наук, на соискание ученой степени доктора наук (категория К1).

В журнале освещаются передовые достижения в сфере стандартиза-
ции 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 высоко-
технологичные методы доклинических и клинических исследований
лекарственных средств, рассматриваются актуальные проблемы фар-
макологии, клинической медицины, вопросы рационального приме-
нения лекарственных препаратов на основе принципов персонализиро-
ванной терапии.

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

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

www.vedomostincesmp.ru

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:	18.02.2025
Дата выхода в свет	28.02.2025
Подписной индекс	в каталоге «Пресса России» — 57942
	в каталоге агентства «Урал-Пресс» — 57942

© Оформление, составление. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2025

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)

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

Кайтель Сюзан, Ph.D. (Бонн, Германия)

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

Кодина Галина Евгеньевна, канд. хим. наук, доцент (Москва, Россия)

Кошеченко Анастасия Сергеевна, канд. фарм. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

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	100 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

Editor-in-Chief:

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

Managing Editor:

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

Executive Editor:

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

Guest Editor for the Special Issue:

Marina V. Zhuravleva, Dr. Sci. (Med.), Prof.

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. 63-42, 63-65)
vedomosti@expmed.ru

www.vedomostincesmp.ru

The journal was founded in 1999.

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

The journal is 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, Research4life, Lens.org, Openaire.eu, Ulrichsweb, Mendeley, Unpaywall, OpenCitations, etc.

The journal's two-year impact factor is 0.571.

The journal is included in the Russian Journal Whitelist and the official List of peer-reviewed scientific journals which guarantee acknowledgment 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 the assessment of medicines 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.

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:	18.02.2025
Date of publication:	28.02.2025
Subscription codes	Pressa Rossii catalogue: 57942
	Ural-Press agency catalogue: 57942

© Compilation, design. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 2025

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)

Dmitriy 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)

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)

Anastasia S. Koshevenko, Cand. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

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

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

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

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)

Registration	The journal is registered as a mass medium by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications. Certificate PI No. FS77-82931 dated March 14, 2022
Contract publisher	NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114
Printing office	Triada Publishing House: 9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver 170034
Print run	100 copies. Free price

Содержание

Том 15, №1 2025

ГЛАВНАЯ ТЕМА:		АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ: РАЗРАБОТКА, КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА, АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ
Р.С. Козлов	8	Стратегия управления антибиотикорезистентностью: задачи и пути решения на современном этапе
Р.И. Ягудина, К.А. Копейка, Д.Г. Карапетян, М.В. Проценко	13	«Идеальный» антибиотик глазами врачей, провизоров и населения (анкетный опрос)
К.Е. Боровкова	24	Формирование устойчивости микроорганизмов в эксперименте <i>in vitro</i> : метод адаптивной лабораторной эволюции (обзор)
С.И. Кулешова, И.А. Денисова, Т.И. Пшеничных	34	Оценка стабильности растворов антибиотиков-цефалоспоринов по показателям «Цветность раствора» и «Примеси»
		БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ
Н.А. Алпатова, О.В. Головинская, М.Л. Байкова, С.Л. Лыскова, Л.А. Гайдарова	44	Экспертная оценка определения специфической активности препаратов моноклональных антител биологическим методом <i>in vitro</i>
		ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
С.Л. Аджахметова, А.Е. Позднякова	57	Разработка методики количественного определения холина в каплях ушных на основе омелы белой листьев экстракта густого
		АПТЕЧНОЕ ИЗГОТОВЛЕНИЕ
С.Э. Эрдни-Гаряев, Д.Д. Мамедов, Д.С. Юрочкин, Д.Д. Зеликова, З.М. Голант, В.С. Фисенко, И.А. Наркевич	63	Нормативное правовое регулирование изготовления лекарственных препаратов аптечными организациями на немецком фармацевтическом рынке. Часть 2. Особенности организации деятельности (обзор)
		КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
И.П. Авакьянц, Е.А. Герасимец, Е.С. Петрова, Д.В. Горячев	82	Планирование программы клинических исследований лекарственных препаратов, применяемых для лечения функциональных расстройств желудочно-кишечного тракта (обзор)
О.В. Шредер, Д.В. Горячев, В.А. Меркулов	92	Основные принципы расчета необходимой численности участников клинических исследований. Часть 2. Анализ выживаемости (обзор)
Д.В. Горячев, И.В. Лыскова, А.А. Черная, Д.Д. Кушнир	105	Планирование клинических исследований радиофармацевтических лекарственных препаратов: анализ международных рекомендаций и экспертного опыта

Contents

Volume 15, No. 1 2025

MAIN TOPIC:		ANTIBACTERIAL AGENTS: DEVELOPMENT, QUALITY CONTROL, ANTIMICROBIAL RESISTANCE
R.S. Kozlov	8	Antimicrobial Resistance Management Strategy: Current Challenges and Solutions
R.I. Yagudina, K.A. Kopeyka, D.G. Karapetyan, M.V. Protsenko	13	The Perfect Antibiotic through the Eyes of Doctors, Pharmacists, and the General Public: An Opinion Survey
K.E. Borovkova	24	Antimicrobial Resistance Development <i>In Vitro</i> : Adaptive Laboratory Evolution Method (Review)
S.I. Kuleshova, I.A. Denisova, T.I. Pshenichnykh	34	Stability of Cephalosporins in Solution in Terms of the Colour of Solution and Impurities
		BIOTECHNOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS
N.A. Alpatova, O.V. Golovinskaya, M.L. Baykova, S.L. Lysikova, L.A. Gaiderova	44	Expert Assessment of <i>In Vitro</i> Potency Assays for Monoclonal Antibody Preparations
		HERBAL MEDICINAL PRODUCTS
S.L. Adzhiakhmetova, A.E. Pozdnyakova	57	Development of an Analytical Procedure for the Quantitative Determination of Choline in Ear Drops Based on <i>Viscum album</i> Leaf Soft Extract
		PHARMACY COMPOUNDING
S.E. Erdni-Garyaev, D.D. Mamedov, D.S. Yurochkin, D.D. Zelikova, Z.M. Golant, V.S. Fisenko, I.A. Narkevich	63	Pharmacy Compounding Regulation in the German Pharmaceutical Market. Part 2. Organisational Features (Review)
		CLINICAL TRIALS
I.P. Avakiants, E.A. Gerasimets, E.S. Petrova, D.V. Goryachev	82	Planning a Clinical Development Programme for Medicinal Products for Functional Gastrointestinal Disorders
O.V. Shreder, D.V. Goryachev, V.A. Merkulov	92	Basic Principles for Calculating the Required Number of Participants in Clinical Trials. Part 2. Survival Analysis (Review)
D.V. Goryachev, I.V. Lysikova, A.A. Chernaia, D.D. Kushnir	105	Planning a Clinical Development Programme for Radiopharmaceuticals: An Analysis of International Guidelines and Expertise



Роман КОЗЛОВ:

«Антибиотикорезистентность — это не просто медицинская проблема, это вызов для всего общества»

Roman S. Kozlov:

‘Antimicrobial resistance is not just a health issue but a challenge for the whole of society’

Р.С. Козлов

Стратегия управления антибиотикорезистентностью: задачи и пути решения на современном этапе

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Крупской, д. 28, г. Смоленск, 214019, Российская Федерация

✉ **Козлов Роман Сергеевич;** roman.kozlov@antibiotic.ru

РЕЗЮМЕ

Антимикробная терапия и борьба с антибиотикорезистентностью являются ключевыми вопросами современной медицины и здравоохранения в целом. Их актуальность обусловлена несколькими фундаментальными причинами, которые затрагивают не только медицинскую, но и социальную, экономическую и даже политическую сферы. Проблема антимикробной терапии требует немедленных и скоординированных действий на глобальном уровне. О важнейших стратегиях рационального применения антибиотиков и управления рисками антимикробной терапии в современных условиях оказания медицинской помощи интервью с заслуженным деятелем науки Российской Федерации, ректором Смоленского государственного медицинского университета, главным внештатным специалистом Минздрава России по клинической микробиологии и антимикробной резистентности, руководителем Сотрудничающего центра ВОЗ по развитию потенциала в области проведения исследований и эпидемиологического надзора за резистентностью к антимикробным препаратам, членом-корреспондентом РАН, доктором медицинских наук, профессором Р.С. Козловым.

Ключевые слова: антибиотикотерапия; антибиотик; антибактериальный препарат; антибиотикорезистентность

Для цитирования: Козлов Р.С. Стратегия управления антибиотикорезистентностью: задачи и пути решения на современном этапе. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(1):8–12. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-8-12>

Roman S. Kozlov

Antimicrobial Resistance Management Strategy: Current Challenges and Solutions

Smolensk State Medical University,
28 Krupskaya St., Smolensk 214019, Russian Federation

✉ Roman S. Kozlov; roman.kozlov@antibiotic.ru

ABSTRACT

Currently, the issues of antimicrobial therapy and antimicrobial resistance are key both for medicine and for healthcare in general for a number of fundamental reasons pertaining not only to the health sector but also to social, economic, and even political spheres. The problem of antimicrobial resistance requires immediate and coordinated global action. This interview discusses the main strategies to ensure rational antimicrobial therapy and manage the associated risks in the current clinical setting with Roman S. Kozlov, Honoured Scientist of the Russian Federation, Rector of Smolensk State Medical University, Chief External Expert in Clinical Microbiology and Antimicrobial Resistance of the Ministry of Health of the Russian Federation, Head of the World Health Organisation Collaborating Centre for Capacity Building on Antimicrobial Resistance Surveillance and Research, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, and Doctor of Medical Sciences.

Keywords: antimicrobial therapy; antibiotics; antibacterial agents; antimicrobial resistance

For citation: Kozlov R.S. Antimicrobial resistance management strategy: Current challenges and solutions. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(1):8–12. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-8-12>

– Роман Сергеевич, вопросы антимикробной терапии, борьбы с антибиотикорезистентностью имеют не только важнейшее медицинское, но и социальное значение, определяют стратегию развития современной клинической фармакологии, фармакотерапии в области применения антимикробных лекарственных препаратов. Почему это так актуально в настоящее время?

Антимикробная терапия и борьба с антибиотикорезистентностью действительно являются одними из ключевых вопросов современной медицины и здравоохранения в целом. Их актуальность обусловлена несколькими фундаментальными причинами, которые затрагивают не только медицинскую, но и социальную, экономическую и даже политическую сферы.

Во-первых, антибиотикорезистентность — это глобальная угроза, которая ставит под вопрос эффективность современной медицины. Мы живем в эпоху, когда антибиотики стали основой лечения бактериальных инфекций. Однако из-за нерационального использования этих препаратов как в медицине, так и в сельском хозяйстве мы наблюдаем стремительный рост устойчивости микроорганизмов. Это приводит к тому, что ранее эффективные антибиотики перестают работать, а инфекции, которые раньше легко поддавались лечению, становятся смертельно опасными. По прогнозам, к 2050 году антибиотикорезистентность может стать причиной

10 миллионов смертей ежегодно, что превысит смертность от онкологических заболеваний.

Во-вторых, социальное значение этой проблемы невозможно переоценить. Антибиотики — это не просто лекарства, это основа современной медицины. Без них невозможны хирургические операции, трансплантация органов, лечение онкологических заболеваний, ведение недоношенных детей и многое другое. Если мы потеряем эффективные антибиотики, мы рискуем откатиться в эпоху до их изобретения, когда даже незначительные раны или инфекции могли привести к летальному исходу.

В-третьих, экономические последствия антибиотикорезистентности колоссальны. Устойчивые инфекции требуют более длительного и дорогостоящего лечения, увеличивают сроки госпитализации и нагрузку на систему здравоохранения. Это создает дополнительное финансовое бремя как для пациентов, так и для государства. По оценкам экспертов, к 2050 году совокупные экономические потери от антибиотикорезистентности могут достичь 100 триллионов долларов.

В-четвертых, стратегия развития клинической фармакологии и фармакотерапии сегодня должна быть направлена на рациональное использование антимикробных препаратов. Это включает в себя не только разработку новых

антибиотиков, но и оптимизацию применения существующих. Мы должны перейти от эмпирического подхода к персонализированной терапии, основанной на данных о резистентности в конкретном регионе или даже в конкретном стационаре. Именно для этого создаются такие проекты, как AMRhub.ru, которые позволяют врачам принимать обоснованные решения на основе актуальной информации.

Наконец, борьба с антибиотикорезистентностью — это междисциплинарная задача, которая требует объединения усилий микробиологов, клинических фармакологов, врачей, эпидемиологов, организаторов здравоохранения и даже политиков. Это не просто медицинская проблема, это вызов для всего общества. И если мы не начнем действовать сейчас, последствия могут быть катастрофическими.

Таким образом, актуальность вопросов антимикробной терапии и борьбы с антибиотикорезистентностью обусловлена их прямым влиянием на здоровье населения, экономику и будущее медицины. Это проблема, которая требует немедленных и скоординированных действий на глобальном уровне.

– А как проявляется эта проблема в России? Не могли бы вы назвать особенности антибиотикорезистентности, присущие именно нашей стране?

Основными особенностями антибиотикорезистентности в Российской Федерации являются:

а) высокий уровень (>30%) резистентности представителей порядка *Enterobacterales*, вызывающих внутрибольничные инфекции, к карбапенемным антибиотикам за счет продукции карбапенемаз и распространения клональной линии *Klebsiella pneumoniae* ST395;

б) высокий уровень экстремальной резистентности (сохранение чувствительности только к 1–2 антибиотикам одной группы) у штаммов *Acinetobacter* spp. (50,2%);

в) высокий уровень экстремальной резистентности (сохранение чувствительности только к 1–2 антибиотикам одной группы) у штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (15,9%);

г) высокий уровень (>20%) резистентности штаммов *Enterococcus faecium*, вызывающих нозокомиальные инфекции, к ванкомицину;

д) высокий уровень (>20%) резистентности штаммов *Escherichia coli*, вызывающих внебольничные интраабдоминальные инфекции и инфекции мочевых путей, к цефалоспорином 3–4-го поколения за счет продукции бета-лактамаз расширенного спектра действия.

При этом рост резистентности указанных микроорганизмов или соответствовал предшествующей динамике и был прогнозируем заранее, или, например в случае внебольничных штаммов *Escherichia coli* и внутрибольничных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, наблюдалось статистически значимое снижение резистентности. Каких-либо новых, не прогнозируемых ранее, значимых биологических угроз по профилю «распространение резистентности» у бактериальных возбудителей инфекций человека не выявлено.

– В последние годы принят ряд важных нормативных правовых актов, определяющих национальные цели развития медицинской и фармацевтической отраслей, которые наряду с такими глобальными задачами, как укрепление здоровья нации и рост продолжительности жизни граждан, включают борьбу с антибиотикорезистентностью и рациональное применение антимикробной терапии. Как вы считаете, что необходимо сделать для реализации стратегии сдерживания антимикробной резистентности?

Утверждение таких важных нормативных правовых документов, как Указ Президента Российской Федерации № 309¹ и распоряжение Правительства № 1495-р², безусловно, является значимым шагом в борьбе с антибиотикорезистентностью и развитии отечественной фармацевтической отрасли. Однако для достижения поставленных целей необходимо реализовать комплекс мер, которые охватят как научно-исследовательскую, так и практическую, образовательную и регуляторную сферы. Для реализации национальных целей, обозначенных в Указе Президента № 309 и распоряжении Правительства № 1495-р, необходимо внедрить обязательный локальный мониторинг антибиотикорезистентности в медицинских учреждениях. Кроме того, необходимо расширить использование цифровых решений, таких как проект AMRhub.ru, для мониторинга резистентности и оптимизации антимикробной терапии на всех уровнях. Также необходимо активно развивать

¹ Указ Президента Российской Федерации от 07.05.2024 № 309 «О национальных целях развития Российской Федерации на период до 2030 года и на перспективу до 2036 года».

² Распоряжение Правительства Российской Федерации от 07.06.2023 № 1495-р «Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года».

отечественную фармацевтическую отрасль, поддерживая разработку новых антибиотиков и локализацию производства, усилить образовательные программы для врачей и населения по рациональному использованию антибиотиков, стимулировать научные исследования в области молекулярных механизмов резистентности и новых методов лечения.

– Антибактериальные средства очень активно применяются при оказании медицинской помощи в условиях стационара, что сопряжено с определенными рисками. Что необходимо сделать, чтобы их минимизировать?

Наиболее важные стратегии рационального применения антибиотиков и управления рисками антимикробной терапии в стационаре сегодня включают несколько ключевых аспектов.

Во-первых, необходимо строгое соблюдение клинических рекомендаций, которые должны регулярно обновляться на основе актуальных данных.

Во-вторых, это внедрение систем мониторинга антибиотикорезистентности, например таких, как AMRcloud.net, которые позволяют анализировать локальные данные и адаптировать терапию к конкретным условиям стационара. Это особенно важно, ведь уровень резистентности может значительно отличаться даже между соседними больницами.

Третий аспект — это оптимизация диагностики. Современные методы, такие как ПЦР, масс-спектрометрия и секвенирование, позволяют быстро и точно выявлять возбудителей и их устойчивость, что значительно повышает эффективность терапии.

Не менее важно обучение и вовлечение в этот процесс медицинского персонала. Врачи, клинические фармакологи и микробиологи должны регулярно повышать квалификацию, чтобы быть в курсе последних рекомендаций и подходов. Междисциплинарное взаимодействие здесь играет ключевую роль.

Также необходимо внедрять системы контроля за назначением антибиотиков, включая аудит назначений и обратную связь для врачей. Это помогает минимизировать необоснованное использование антибиотиков и снизить риск развития резистентности.

Наконец, важно использовать цифровые технологии, такие как AMRexpert.ru, которые автоматизируют процесс проверки микробиологического заключения конкретного микроорганизма

и помогают врачам принимать обоснованные решения. Интеграция таких систем с электронными медицинскими картами делает процесс еще более удобным и эффективным.

Все эти стратегии в совокупности позволяют не только повысить эффективность антимикробной терапии, но и сдержать рост антибиотикорезистентности, что является одной из главных задач современной медицины.

– Как можно реализовать важнейший принцип «Noli nocere» в области антибактериальной терапии и контроля качества и безопасности медицинской деятельности с фокусом на антибиотиках?

Реализация принципа «Noli nocere» в антибактериальной терапии требует сочетания точной диагностики, рационального использования антибиотиков, постоянного мониторинга резистентности, обучения персонала и внедрения современных технологий. Только так мы можем обеспечить безопасность и качество медицинской помощи, минимизируя риски для пациентов.

– Что, на ваш взгляд, является наиболее перспективным в разработке инновационных антибактериальных лекарственных препаратов и развитии стратегии импортозамещения?

Наиболее перспективными в разработке инновационных антибактериальных препаратов и развитии стратегии импортозамещения я считаю несколько ключевых направлений.

Во-первых, это создание препаратов с новыми механизмами действия, которые смогут преодолевать существующие механизмы резистентности. Сегодня многие исследования сосредоточены на разработке антибиотиков, воздействующих на ранее не изученные мишени в бактериальной клетке, таких как новые ферменты или компоненты клеточной стенки. Это открывает дополнительные возможности для борьбы с устойчивыми штаммами, включая «супербактерии».

Во-вторых, важным направлением является разработка комбинированных препаратов, которые сочетают антибиотики с ингибиторами. Например, комбинации бета-лактамов с ингибиторами бета-лактамаз уже доказали свою эффективность. Такие подходы позволяют восстановить активность существующих антибиотиков и продлить их жизненный цикл.

Третье перспективное направление — это использование биотехнологий и нанотехнологий.

Например, разработка антимикробных пептидов, которые могут быть эффективны против широкого спектра патогенов, или использование наночастиц для доставки антибиотиков непосредственно к очагу инфекции. Это не только повышает эффективность терапии, но и снижает риск побочных эффектов.

Что касается стратегии импортозамещения, то здесь важно развитие отечественной фармацевтической промышленности. Это включает создание современных производственных мощностей для выпуска антибиотиков и их активных фармацевтических субстанций. Необходимо стимулировать локализацию производства, предоставляя налоговые льготы и гранты для компаний, которые занимаются разработкой и производством антибиотиков.

Кроме того, важно укрепление научно-исследовательской базы. Это включает поддержку фундаментальных исследований в области молекулярных механизмов резистентности, а также прикладных исследований, направленных на создание новых препаратов. Сотрудничество

между научными институтами, университетами и фармацевтическими компаниями может ускорить процесс разработки и внедрения инновационных решений.

Наконец, важно интегрировать отечественные разработки в международные исследования и рынки. Это позволит не только укрепить позиции России на глобальной арене, но и привлечь дополнительные ресурсы для развития отрасли.

Резюмируя, коротко еще раз повторю, что борьба с антибиотикорезистентностью и повышение эффективности антимикробной терапии — это стратегически важные задачи, которые, как и многие медицинские проблемы, требуют комплексного подхода, который объединяет мониторинг резистентности, цифровизацию, обучение персонала, разработку рекомендаций и научные исследования и объединения усилий на всех уровнях: от локального до национального и международного. Только так мы сможем эффективно бороться с антибиотикорезистентностью, обеспечить безопасность и качество медицинской помощи для пациентов по всей стране.



Р.И. Ягудина¹
К.А. Копейка¹
Д.Г. Карапетян²
М.В. Проценко¹

«Идеальный» антибиотик глазами врачей, провизоров и населения (анкетный опрос)

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

² 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

✉ Ягудина Роза Исмаиловна; yagudina_r_i@staff.sechenov.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Рациональный подход к выбору антибиотика является важным условием успешного лечения инфекционных заболеваний, в том числе снижает риск формирования резистентности микроорганизмов. В современных условиях становится особенно важным понять, какие критерии при выборе антибиотиков учитывают врачи и провизоры, а что приоритетно для пациентов, ведь именно пациентоориентированный подход зачастую определяет длительность соблюдения рекомендаций и эффективность терапии. В связи с тем что представления об «идеальном» антибиотике могут существенно различаться, актуальной задачей является систематизация этих представлений и выявление ключевых критериев, которые врачи, провизоры и население считают приоритетными в антибиотикотерапии (на примере лечения инфекций нижних дыхательных путей).

ЦЕЛЬ. Выявление мнения врачей, провизоров и населения об особенностях выбора «идеального» антибиотика и современном состоянии антибиотикотерапии инфекций нижних дыхательных путей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Проведено социологическое исследование с использованием анкетирования. Анкеты были разработаны для специалистов здравоохранения и потребителей антибиотиков. В опросе приняли участие 250 специалистов (врачи и провизоры) и 150 респондентов из категории «население».

РЕЗУЛЬТАТЫ. Большинство специалистов (55,6% врачей и 53,7% провизоров) считают, что антибиотики «очень часто» назначаются для лечения инфекций нижних дыхательных путей. Врачи и провизоры считают, что основными факторами, способствующими антибиотикорезистентности, являются необоснованное назначение антибиотиков (21,0% врачей и 24,1% провизоров), слишком частые курсы антибиотикотерапии (17,2% и 21,5%) и ошибки в выборе препарата (16,9% для обеих групп). При выборе «идеального» антибиотика специалисты и население придают наибольшее значение эффективности, безопасности и хорошей переносимости. Большинство врачей (93,7%) и провизоров (83,0%) активно информируют пациентов о правилах приема антибиотиков. При выборе антибиотиков для детей наибольшее значение придается минимизации риска аллергической реакции, удобству дозирования и наличию инструкции для расчета дозы. Все группы респондентов сошлись во мнении, что сироп является наиболее предпочтительной лекарственной формой для детей. Только 42,2% врачей всегда выписывают рецепт на антибиотик, а 53,3% провизоров регулярно сталкиваются с отсутствием рецепта у покупателей.

ВЫВОДЫ. Результаты проведенного социологического исследования среди врачей, провизоров и населения выявили факт недостаточного соблюдения правовых норм отпуска рецептурных антибиотиков врачами, необоснованное

их назначение, частое применение курсов антибиотикотерапии, а также ошибки в выборе препарата. Материалы могут быть использованы для разработки рекомендаций по антибиотикотерапии нижних дыхательных путей в рамках образовательного процесса дополнительного профессионального образования специалистов в сфере обращения лекарственных средств.

Ключевые слова: антибиотикотерапия; критерии выбора; антибактериальный препарат; антибиотик; антибиотикорезистентность; анкетирование; мнение специалистов; мнение населения; социологическое исследование; социологический опрос

Для цитирования: Ягудина Р.И., Копейка К.А., Карапетян Д.Г., Проценко М.В. «Идеальный» антибиотик глазами врачей, провизоров и населения (анкетный опрос). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(1):13–23. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-13-23>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Р.И. Ягудина — член редакционной коллегии журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» с 2011 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Roza I. Yagudina¹ 
Kirill A. Kopeyka¹ 
Diana G. Karapetyan² 
Marina V. Protsenko¹ 

The Perfect Antibiotic through the Eyes of Doctors, Pharmacists, and the General Public: An Opinion Survey

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

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

✉ Roza I. Yagudina; yagudina_r_i@staff.sechenov.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. A rational approach to antibiotic selection is a key factor in the successful treatment of various infections, and it also reduces the risk of antimicrobial resistance. Under the current circumstances, it is particularly important to understand what criteria doctors and pharmacists consider when selecting antibiotics and what patients see as priorities. After all, it is often the patient-centred approach that determines both medication persistence and treatment effectiveness. Given that perceptions of the perfect antibiotic can vary greatly, it is important to summarise these perceptions and identify the key criteria that doctors, pharmacists, and the general public consider as priorities for antibiotic therapy (with treatment of lower respiratory tract infections as a case study).

AIM. This study aimed to identify the opinions of doctors, pharmacists, and the general public on selecting the perfect antibiotic and on the current state of antibiotic therapy for lower respiratory tract infections.

MATERIALS AND METHODS. This study included an opinion survey using questionnaires. The questionnaires were developed specifically for health professionals and antibiotic consumers. The sociological study involved 250 health professionals (doctors and pharmacists) and 150 respondents from the general public.

RESULTS. The majority of health professionals (55.6% of doctors and 53.7% of pharmacists) believe that antibiotics are “very often” prescribed for lower respiratory tract infections. Health professionals think that the main factors contributing to antimicrobial resistance are “unjustified prescription of antibiotics” (21.0% of doctors and 24.1% of pharmacists), “overly frequent courses of antibiotics” (17.2% of doctors and 21.5% of pharmacists), and “errors in antibiotic selection” (16.9% for both groups). Most doctors (93.7%) and pharmacists (83.0%) actively instruct patients in the proper use of antibiotics. When selecting the perfect antibiotic, health professionals and the public prioritise efficacy, safety, and tolerability. The most significant factors in selecting antibiotics for children include minimal risk of allergic reactions, convenience of dosing, and availability of dose calculation guidelines. Syrup is the most preferable paediatric dosage form for all groups of respondents. Only 42.2% of doctors claim that they

always provide patients with a prescription for antibiotics, and 53.3% of pharmacists regularly encounter customers without a prescription.

CONCLUSIONS. This survey of doctors, pharmacists, and the public has identified cases of poor compliance with the regulations for dispensing and prescribing antibiotics on the part of doctors and cases of prescribing antibiotics without sound clinical justification, administering antibiotics without appropriate treatment-free intervals between courses, and making errors in antibiotic selection. Study materials may inform the development of recommendations on antibiotic treatment of lower respiratory tract infections to be used as part of continuing professional training curricula for specialists dealing with medicines throughout the pharmaceutical product lifecycle.

Keywords: antibiotic therapy; antibiotic selection criteria; antibacterial agent; antibiotic; antimicrobial resistance; questionnaire; specialist opinion; public opinion; sociological study; opinion survey

For citation: Yagudina R.I., Kopeyka K.A., Karapetyan D.G., Protsenko M.V. The perfect antibiotic through the eyes of doctors, pharmacists, and the general public: An opinion survey. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(1):13–23. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-13-23>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. Roza I. Yagudina has been a member of the Editorial Board of *Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2011. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотики представляют собой одну из групп антибактериальных химиотерапевтических средств биологического или полусинтетического происхождения, которые способны избирательно действовать в отношении микроорганизмов¹. С момента открытия пенициллина они стали незаменимым инструментом в руках врачей в борьбе с инфекционными заболеваниями.

Респираторные инфекции являются одной из наиболее частых причин обращения за медицинской помощью и назначения антибиотиков [1, 2]. Среди них особое место занимают инфекции нижних дыхательных путей, которые не только широко распространены, но и при отсутствии своевременной и адекватной терапии могут приводить к серьезным осложнениям и последствиям [3].

Инфекции нижних дыхательных путей — это группа заболеваний, которые преимущественно поражают бронхи, бронхиолы и легкие. К ним относятся внебольничная пневмония, острый бронхит и хроническая обструктивная болезнь легких [4]. Данные заболевания не только сохраняют лидирующие позиции в списке показаний для назначения антибактериальных средств, но и становятся основной причиной их необоснованного использования. Несмотря на широкий ассортимент доступных антибактериальных препаратов, растущая резистентность микроорганизмов к ним ставит под угрозу успешность терапии инфекций дыхательных путей [5].

Использование антибиотиков без четкого клинического показания, неполные курсы лечения и самолечение способствуют адаптации бактерий и утрате чувствительности к препаратам. Одним из наиболее весомых последствий чрезмерного и неконтролируемого приема антибиотиков является селекция и активное распространение антибиотикорезистентных штаммов возбудителей респираторных инфекций [6]. Эта тенденция находится в центре внимания мирового медицинского сообщества, поскольку она представляет угрозу успешному лечению инфекционных заболеваний и затрагивает здоровье многих пациентов [7–9].

Антибиотикорезистентность не только снижает эффективность терапии, но и вызывает ряд экономических и социальных последствий. Появление резистентных штаммов приводит к росту продолжительности госпитализации пациентов, что повышает затраты на их пребывание и лечение в стационаре [10]. Также увеличивается общая смертность от респираторных инфекций из-за невозможности провести эффективную антибактериальную терапию [11].

Рациональный выбор антибиотика играет решающую роль в успешном лечении инфекций нижних дыхательных путей, определяя как быструю выздоровления пациента, так и снижение риска развития резистентности. Однако, несмотря на множество доступных антибактериальных препаратов, «идеальный» антибиотик для каждого конкретного случая определяется рядом

¹ Зверев ВВ, Бойченко МН. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник. Т. 1. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.

факторов, включая тип инфекции, возбудителя, историю лечения пациента и др. С учетом высокой степени вариативности клинических случаев представления о том, что же является «идеальным» антибиотиком, могут существенно различаться.

Цель работы — выявление мнения врачей, провизоров и населения об особенностях выбора «идеального» антибиотика и современной ситуации в области антибиотикотерапии инфекций нижних дыхательных путей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании были использованы две группы методов: информационно-аналитические (обработка и статистический анализ информации) и социологические (метод опроса). Для проведения опроса были разработаны две анкеты: анкета 1 предназначалась для специалистов здравоохранения (врачей и провизоров), анкета 2 — для потребителей антибиотиков (населения). Обе анкеты включали вопросы с выбором одного или нескольких вариантов ответа, а также оценку значимости различных свойств антибиотиков по 5-балльной шкале.

Анкеты содержали вопросы, касающиеся значимых свойств и характеристик «идеального» антибиотика, особенностей применения антибиотиков у взрослых и в педиатрии. Анкета для специалистов была более подробной и затрагивала профессиональные аспекты применения антибиотиков: наиболее частые инфекции и возбудители, факторы риска антибиотикорезистентности, практику выписывания рецептов и информирования пациентов. Анкета для населения фокусировалась на вопросах, актуальных для потребителей: факторах, влияющих на решение о покупке антибиотика, обращении за консультацией в аптеку, приверженности лечению, приемлемой цене. Обе анкеты заполнялись респондентами самостоятельно и анонимно.

Анкетирование было проведено в период с 10 августа по 10 октября 2023 г. Приглашения к участию в анкетировании и анкетные формы были отправлены провизорам — работникам первого стола аптечных организаций различных форм собственности, врачам различных специализаций, а также неспециалистам (населению) из различных регионов России. Перед началом основного исследования был проведен пилотаж анкеты с участием 10 специалистов (5 провизоров и 5 врачей) и 5 посетителей аптек. В ходе пробного опроса оценивалась ясность

формулировок вопросов, однозначность трактовки применяемых терминов и логичность структуры анкеты. По результатам предварительного тестирования в анкете была оптимизирована последовательность вопросов, подтверждена валидность анкеты и адекватность используемых терминов.

Для определения достоверного (репрезентативного) количества респондентов (численность анкет) использовали метод случайной бесповторной выборки. Участниками опроса были три независимые выборки: врачи, провизоры, население. Учитывая тот факт, что определение генеральной совокупности (количество респондентов) не представляется возможным, для установления репрезентативности данных необходимо было установить предельную величину ошибки выборки. Проведенные расчеты показали, что для получения достоверных результатов необходимо статистически обработать не менее 100 анкет из каждой независимой выборки (при доверительной вероятности 95% и погрешности 10%).

Значения интервальных величин представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое, m — стандартная ошибка среднего.

При оценке статистической значимости различий между группами использовался непараметрический критерий хи-квадрат Пирсона (χ^2). Этот метод был выбран как наиболее подходящий для анализа данных, полученных в результате анкетирования. Различия ответов разных групп респондентов исследовались с помощью таблиц сопряженности. Для всех статистических тестов был установлен уровень значимости $p=0,05$. При значении $p<0,05$ различия считались статистически значимыми, что позволяло отвергнуть нулевую гипотезу об отсутствии различий между группами. Анализ данных выполнен с использованием пакета программ Microsoft Excel 2019.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В опросе приняли участие 250 специалистов сферы здравоохранения (врачи и аптечные работники) и 150 респондентов, представляющих категорию «население». Основную часть респондентов-специалистов составили врачи различных специализаций (142 участника), 108 участников опроса — провизоры — работники первого стола аптечных организаций различных форм собственности. Все специалисты имели высшее образование, средний стаж работы врачей составил $14,4 \pm 1,6$; провизоров — $13,7 \pm 1,9$ года.

Среди опрошенных врачей наибольшую долю составили терапевты (38,5%), клинические фармакологи (21,6%) и педиатры (13,9%). Кроме того, в опросе участвовали организаторы здравоохранения (7,3%), пульмонологи (6,6%), анестезиологи-реаниматологи (5,3%), инфекционисты (4,6%) и представители других специальностей (2,2%)

Среди респондентов категории «население» большинство составили женщины (80,3%), средний возраст респондентов – 49,1±4,2 года; 71,4% опрошенных имели высшее образование, 23,2% – среднее специальное, 5,4% – среднее образование.

Основной причиной обращения в медицинскую организацию пациентов с различными инфекциями нижних дыхательных путей, по мнению врачей, является внебольничная пневмония (43%), в то время как обострение хронического бронхита и хронической обструктивной болезни легких отметили 26% специалистов (рис. 1). Провизоры же считают, что наиболее частой причиной обращения за медицинской помощью является обострение хронического бронхита (55%; $\chi^2=9,66$; $p=0,002$), хроническая обструктивная болезнь легких встречается в 20% ответов.

Согласно результатам опроса большинство врачей (55,6%) и провизоров (53,7%) указали, что антибиотики для лечения инфекций нижних дыхательных путей назначаются «очень часто» ($\chi^2=0,09$; $p=0,764$). При этом доля тех, кто считает, что антибиотики назначаются «часто», составляет 44,4% в обеих группах. Только небольшая доля провизоров (1,9%) считает, что антибиотики назначаются «редко», среди врачей такое мнение отсутствует.

Врачи считают, что основными этиологически значимыми возбудителями инфекций нижних дыхательных путей являются следующие бактерии: *Streptococcus pneumoniae* (38,2%), *Haemophilus influenzae* (23,9%), *Moraxella catarrhalis* (11,8%), *Pseudomonas aeruginosa* (9,4%), бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (10,6%). По мнению провизоров, основанному на их теоретических знаниях и практическом опыте взаимодействия с пациентами, *S. pneumoniae* играет более значительную роль в обострениях ($\chi^2=6,24$; $p=0,012$), составляя 54,0% всех случаев. Это может быть связано с тем, что *S. pneumoniae* является наиболее широко известным возбудителем пневмонии и других серьезных инфекций дыхательных путей. *H. influenzae* составляет 19,5%, *M. catarrhalis* – 5,7%, *P. aeruginosa* – 6,9% и бактерии семейства *Enterobacteriaceae* – 6,9%. Группа «Другое», включающая *Streptococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, была отмечена примерно одинаково обеими группами (около 6% ответов).

Вопрос антибиотикорезистентности и ее причин вызывает большую обеспокоенность среди специалистов здравоохранения: 21,0% врачей и 24,1% провизоров считают необоснованное назначение антибактериальных средств ключевым фактором, способствующим антибиотикорезистентности ($\chi^2=0,32$; $p=0,572$). Проблема слишком частых курсов антибиотикотерапии была отмечена 17,2% врачей и 21,5% провизоров. Обе категории респондентов также отмечают ошибки в выборе антибактериального препарата (16,9% в обеих группах), ошибки в дозировании антибиотика (14,5% у врачей против 12,8% у провизоров) и низкую приверженность пациентов к лечению (10,9 и 10,3%) в качестве

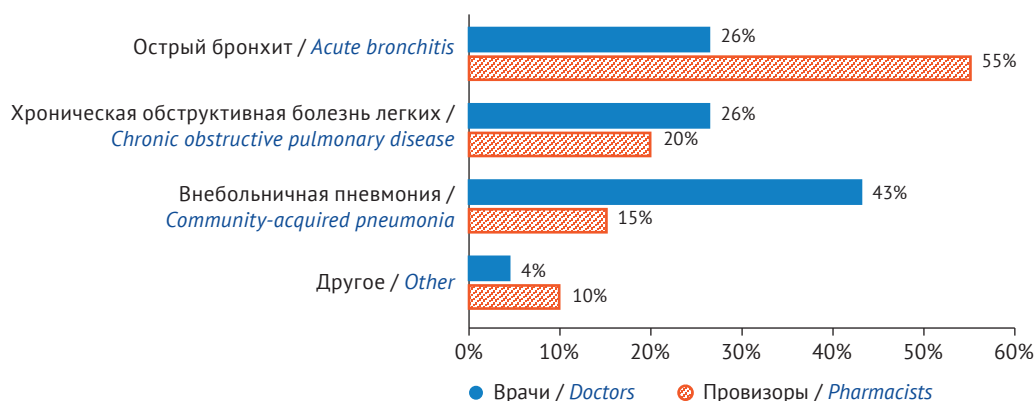


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 1. Распределение ответов респондентов при выборе основных причин обращения за медицинской помощью с различными инфекциями нижних дыхательных путей

Fig. 1. Distribution of respondents' answers regarding the main reasons for seeking medical help for various lower respiratory tract infections

основных факторов риска, способствующих антибиотикорезистентности. Меньшее влияние оказывают частые обострения заболевания (врачи — 3,6%, провизоры — 3,1%), частые курсы системных глюкокортикоидов (3,1% и 1,5%) и бронхоэктазы (2,8% и 0,5%). В разделе «другое» 1,1% врачей и 2,1% провизоров указали на такие проблемы, как неполный курс лечения, отказ от проведения предварительного исследования на чувствительность и качество генерических препаратов.

Как показали результаты анкетирования, большинство пациентов, принимающих антибиотики (64,5%), соблюдают предписания врачей относительно длительности курса, что важно для предотвращения развития резистентности к антибиотикам. Однако почти 18% опрошенных прекращают прием антибиотика при наступлении улучшения состояния, не завершая полный курс лечения.

По мнению врачей, наибольшее влияние на приверженность к лечению оказывает доверие к врачу (15,1%), в то время как для провизоров главным фактором является частота приема препарата (15,7%) (рис. 2). Несмотря на различия в профессиональных акцентах, разница статистически не значима ($\chi^2=0,02$; $p=0,888$). Побочные эффекты препарата также считаются важным аспектом, влияющим на комплаенс, согласно результатам опроса (врачи — 13,2%, провизоры — 14,3%). Мотивация пациента и приемлемость лекарственной формы играют значительную роль,

как считают врачи (13,9% и 11,5%), провизоры придают этим факторам несколько меньше значения (11,4% и 8,6%), хотя это различие статистически незначимо ($\chi^2=0,35$; $p=0,554$ и $\chi^2=0,53$; $p=0,467$), что указывает на относительное единство взглядов специалистов на роль данных факторов в обеспечении приверженности к лечению. Другие факторы, такие как вера в успех лечения, ограничение вредных привычек, пример других, выполнение нелекарственных процедур, также были отмечены, но в меньшей степени.

Респонденты поделились своим видением того, какими свойствами должен обладать «идеальный» антибиотик при лечении нижних дыхательных путей. Оценка производилась по 5-балльной шкале, где 5 — максимально необходимое свойство, 1 — незначительное свойство. Наибольшую важность имеют: эффективность ($4,4\pm0,2$ — врачи, $4,4\pm0,4$ — провизоры и $4,3\pm0,3$ балла население), безопасность ($4,3\pm0,5$ — врачи, $4,1\pm0,6$ — провизоры и $4,0\pm0,3$ — население), хорошая переносимость ($4,4\pm0,2$ — врачи, $4,4\pm0,3$ — провизоры, $4,3\pm0,3$ — население), удобный способ введения ($3,9\pm0,4$ и $3,8\pm0,3$ — специалисты, $3,1\pm0,4$ — население), минимальный риск резистентности ($3,9\pm0,4$ и $3,8\pm0,3$ — специалисты, $3,1\pm0,3$ — население), «хорошая» фармакокинетика (накопление в тканях, метаболическая стабильность, длительный период полувыведения) ($3,9\pm0,5$ и $3,8\pm0,3$ — специалисты), широкий спектр антибактериального действия ($3,1\pm0,4$ и $3,6\pm0,4$ — специалисты, $3,1\pm0,4$ — население), ценовая

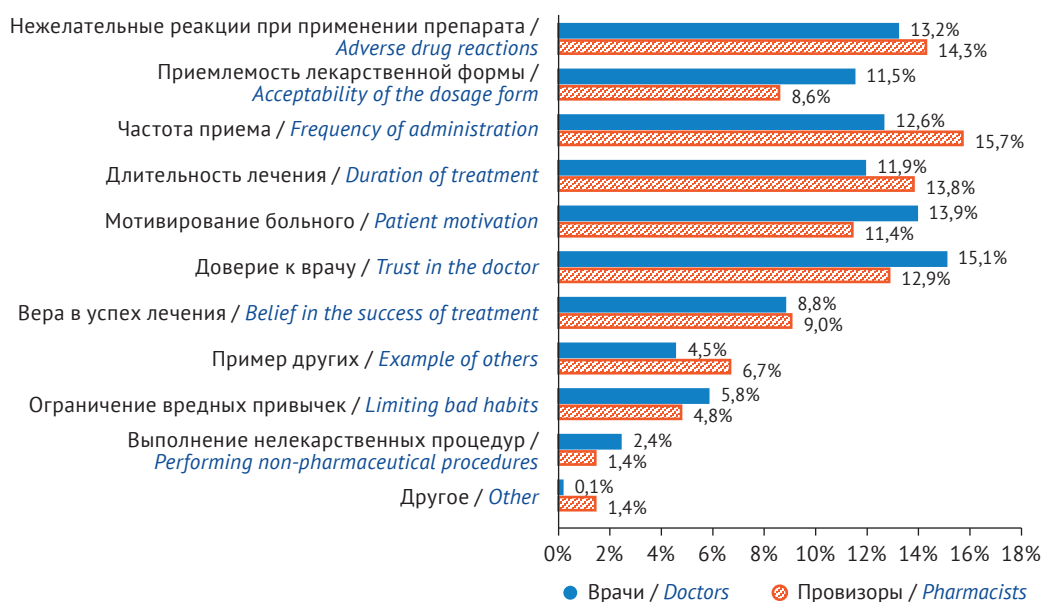


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 2. Распределение ответов респондентов при выборе основных факторов, влияющих на комплаентность пациента

Fig. 2. Distribution of respondents' answers regarding the main factors influencing patient adherence

доступность ($3,2 \pm 0,3$ и $3,5 \pm 0,5$ — специалисты, $3,3 \pm 0,2$ — население).

Мнения специалистов и населения в целом совпадают по ключевым признакам — таким как эффективность ($\chi^2=1,8$; $p=0,406$), безопасность ($\chi^2=3,2$; $p=0,202$) и хорошая переносимость ($\chi^2=2,1$; $p=0,350$) — статистически значимых различий между группами нет. Однако для населения более важным оказалось удобство способа введения ($\chi^2=59,1$; $p<0,001$), в то время как врачи уделяют больше внимания широте спектра действия ($\chi^2=54,8$; $p<0,001$) и минимизации риска развития резистентности ($\chi^2=24,8$; $p<0,001$). Кроме того, население меньше обеспокоено взаимозаменяемостью ($\chi^2=15,8$; $p<0,001$) и органолептическими свойствами ($\chi^2=22,5$; $p<0,001$) антибиотика, чем специалисты здравоохранения.

Что касается ценовой доступности антибиотиков, результаты опроса населения показали, что для большинства респондентов (40,4%) ценовой фактор не является определяющим при выборе антибиотика, уступая по значимости другим характеристикам, таким как эффективность и безопасность. 28,1% опрошенных считают приемлемой ценой от 500 до 1000 рублей, 18% готовы заплатить от 200 до 500 рублей, а 10,1% — до 200 рублей. Лишь небольшая часть респондентов (3,5%) готова потратить на покупку антибиотика более 1000 рублей.

В ответ на вопрос о том, интересуются ли пациенты информацией о правилах приема антибиотиков, большинство врачей (85,0%) и провизоров (77,8%) ответили утвердительно. Небольшое количество специалистов (6,3% врачей и 7,4% провизоров) указали на отсутствие такого интереса, в то время как 8,7 и 14,8% затруднились ответить на данный вопрос. Результаты анкетирования населения показали, что 53,5% респондентов обращаются к аптечным работникам за консультацией по приему антибиотиков, из них 8,9% делают это всегда, а 44,6% — иногда. В то же время 46,4% опрошенных никогда не обращаются за подобной консультацией к провизорам. Среди причин, побуждающих население обратиться к аптечным работникам за консультацией, наиболее частой оказалось возникновение дополнительных вопросов при покупке препарата (47,3%). Для 12,3% респондентов информация, полученная от врача, была непонятной, а для 8,8% — неполной. Лишь 3,3% опрошенных обращаются к провизорам с вопросами о сочетаемости антибиотиков с уже принимаемыми препаратами.

Большинство специалистов в области здравоохранения придают первостепенное значение правильному информированию пациентов о методах и правилах приема антибиотиков. Подавляющее большинство врачей (93,7%) указали, что объясняют пациентам правила приема антибиотиков. Лишь небольшое количество врачей (1,4%) отметило, что не делает этого, а около 5% затруднились дать однозначный ответ на этот вопрос. Среди провизоров 83,0% также подтвердили, что объясняют правила приема антибиотиков. Около 6% провизоров ответили отрицательно, а 11,3% затруднились ответить на вопрос. Таким образом, большая часть медицинских специалистов, включая врачей и провизоров, информирует пациентов о правилах приема антибиотиков. Однако достаточно высокая доля тех, кто затруднился ответить или дал отрицательный ответ, особенно среди провизоров, что подчеркивает важность дополнительного обучения и напоминания о необходимости информирования.

Что касается времени, уделяемого объяснению, то здесь наблюдается следующая закономерность: в целом большинство врачей (37,1%) и провизоров (48,1%) тратят до 3 мин на объяснение правил приема антибиотиков ($\chi^2=0,12$; $p=0,729$) (рис. 3). В то же время большее число провизоров (32,7%), чем врачей (23,6%), отметили, что тратят на это менее 1 мин (различие не достигает статистической значимости; $\chi^2=2,64$; $p=0,104$). Однако интересно, что доля врачей (32,1%), которые считают, что уделяют этому процессу до 5 мин, заметно выше, чем среди провизоров (17,3%; $\chi^2=7,83$; $p=0,005$). Это может отражать разные подходы к обучению пациентов и различное понимание значимости этого процесса среди двух групп специалистов, а также разницу в условиях работы.

Следующий блок вопросов был посвящен особенностям выбора антибиотиков в педиатрии: их характеристикам, лекарственным формам и вкусовым свойствам.

Наибольшее значение специалисты и население придают минимизации риска аллергической реакции на сам антибиотик. Все три группы респондентов придают большое значение этому аспекту. Врачи оценивают его в $4,5 \pm 0,1$ балла, провизоры — в $4,6 \pm 0,2$ балла, а население — в $4,8 \pm 0,2$ балла. Также высоко ценится удобство дозирования ($4,5 \pm 0,3$ — врачи, $4,4 \pm 0,5$ — провизоры, $4,3 \pm 0,2$ — население) и понятная инструкция для расчета дозы на кг массы тела ($4,6 \pm 0,4$ — врачи, $4,0 \pm 0,3$ — провизоры, $4,5 \pm 0,1$ — население).

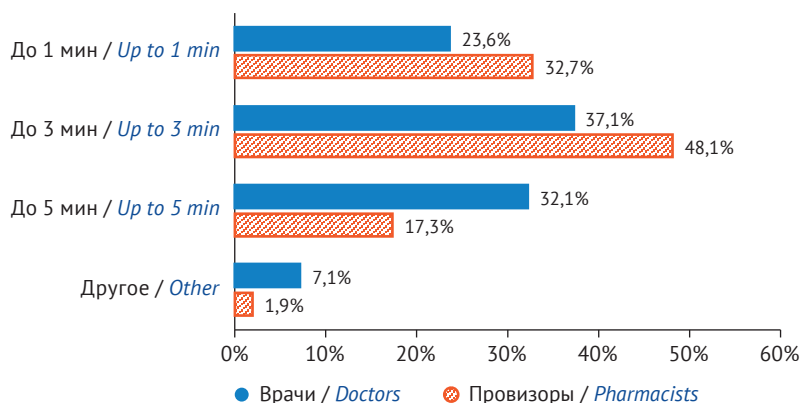


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 3. Распределение ответов респондентов при оценке времени, необходимого для объяснения правил приема антибиотиков

Fig. 3. Distribution of respondents' answers regarding the time required to instruct patients in the proper use of antibiotics

Это подтверждает значимость точного и удобного способа расчета дозы, что особенно важно в педиатрии, где дозировка часто зависит от веса ребенка. Вкус лекарства, который может быть решающим фактором для детей, оценили в $4,3 \pm 0,2$, $4,0 \pm 0,3$ и $3,8 \pm 0,3$ балла соответственно. Врачи оценивают минимизацию риска аллергической реакции на вспомогательные вещества всего в $0,3 \pm 0,3$ балла, провизоры считают этот аспект важным и оценивают в $2,6 \pm 0,2$ балла, а население дает оценку в $3,1 \pm 0,3$ балла.

Приоритеты при выборе антибиотика для детей у врачей, провизоров и населения в целом совпадают, но есть некоторые различия в оценке отдельных характеристик, особенно когда речь идет о риске аллергии на вспомогательные вещества и вкусовых свойствах препарата.

При анализе ответов врачей, провизоров и населения на вопрос о том, какая информация по правилам приема обычно интересует родителей или иных родственников, приобретающих антибиотики для детей, все три группы респондентов сходятся во мнении, что режим дозирования, частота приема и курс приема являются наиболее важными аспектами. Тем не менее оценка значимости этих параметров различаются между группами. Все группы респондентов выделяют режим дозирования ($2,7 \pm 0,2$ у врачей, $3,7 \pm 0,1$ у провизоров и $4,9 \pm 0,4$ у населения), частоту приема ($2,6 \pm 0,3$, $3,9 \pm 0,5$ и $4,3 \pm 0,3$ соответственно), побочные действия ($3,1 \pm 0,4$, $2,5 \pm 0,4$ и $4,5 \pm 0,5$) и противопоказания ($2,9 \pm 0,3$, $2,3 \pm 0,2$ и $4,5 \pm 0,4$). Тем не менее оценки, данные населением и провизорами, значительно выше по большинству параметров по сравнению с оценками врачей.

Одним из вопросов, рассмотренных при анкетировании, были предпочтения лекарственной

формы для применения в педиатрии. Сироп был отмечен как самая предпочтительная лекарственная форма антибиотика для детей всеми группами респондентов (врачи — $4,7 \pm 0,2$, провизоры — $4,1 \pm 0,4$, население — $4,7 \pm 0,4$ балла). Его легко дозировать, и он часто имеет приятный вкус, что упрощает процесс приема для ребенка. Диспергируемые таблетки получили оценку в $3,6 \pm 0,3$ балла от врачей, $3,3 \pm 0,2$ от провизоров и $3,4 \pm 0,3$ от населения, что также делает такую форму довольно популярным выбором. Такие таблетки можно растворить в воде, получая при этом раствор, что делает их адаптируемыми к потребностям ребенка и предпочтениям родителей.

Порошок для приготовления раствора получил средние оценки от всех групп (врачи — $2,8 \pm 0,1$, провизоры — $2,5 \pm 0,4$, население — $3,0 \pm 0,3$). Раствор для инъекций был оценен немного выше врачами ($3,3 \pm 0,2$), чем провизорами ($2,4 \pm 0,1$) и населением ($1,5 \pm 0,2$). Несмотря на то что инъекции менее комфортны для детей, в некоторых случаях это наиболее эффективный и быстрый способ введения антибиотика.

Таблетки и капсулы получили самые низкие оценки от всех респондентов. Таблетки были оценены на $2,3 \pm 0,4$ балла врачами и провизорами, и на $2,3 \pm 0,2$ балла населением, капсулы получили $2,0 \pm 0,4$ балла от врачей, $2,1 \pm 0,3$ от провизоров и $2,5 \pm 0,2$ от населения. Хотя таблетки и капсулы являются наиболее широко применяемыми формами лекарственных средств для взрослых, для детей они менее приемлемы из-за трудностей с глотанием и дозированием.

Таким образом, мнения всех групп респондентов в целом совпадают — сироп и диспергируемые таблетки являются наиболее предпочтительными лекарственными формами антибиотиков

для детей, в то время как таблетки и капсулы наименее удобны.

Вкус лекарственного препарата может сильно влиять на желание ребенка принимать лекарство. Добавки с фруктовым вкусом получили наивысшие оценки среди всех групп респондентов (врачи — $4,4 \pm 0,3$, провизоры — $3,7 \pm 0,6$, население — $4,4 \pm 0,4$ балла). Фруктовые ароматизаторы, как правило, делают вкус лекарства более приемлемым для детей. Подобные добавки могут маскировать неприятный вкус активного ингредиента, что упрощает прием лекарственного препарата.

Добавление сахара получило относительно низкие оценки ($2,4 \pm 0,3$ для врачей и провизоров, $2,2 \pm 0,3$ для населения). Сахар традиционно использовался для улучшения вкуса многих лекарств, однако он противопоказан при сахарном диабете или иных заболеваниях, требующих гликемического контроля. По этой причине многие специалисты и потребители могут быть против его добавления в лекарства.

Добавление сахарозаменителей также не получило высоких оценок (врачи — $2,3 \pm 0,1$, провизоры — $2,5 \pm 0,2$, население — $2,3 \pm 0,2$). Сахарозаменители могут быть альтернативой сахару, однако некоторые из них могут оставлять послевкусие или вызывать пищевую непереносимость, что может объяснить их относительно низкую популярность среди всех групп респондентов.

В целом, все три группы респондентов едины в своих предпочтениях: антибиотик для детей, скорее всего, будет более привлекателен, если его вкус будет скорректирован фруктовыми добавками. Менее привлекательными являются добавки на основе сахара и сахарозаменителей.

Как уже отмечалось выше, антибиотики являются ключевым инструментом в борьбе с бактериальными инфекциями, и их неправильное использование может привести к различным проблемам, включая развитие резистентности у микроорганизмов. Поэтому важно понять, как врачи, провизоры и население следуют рецептурному порядку при назначении, продаже и приобретении антибиотиков.

В ходе исследования выявлено, что 42,2% опрошенных врачей всегда выписывают рецепт на антибиотик, в то время как 38,8% ограничиваются выпиской назначения.

Среди населения 55,4% респондентов отметили, что врач всегда выписывает рецепт

при назначении антибиотика, а 33,9% указали, что рецепт выписывается иногда. Только 10,7% опрошенных сообщили, что врач никогда не выписывает рецепт на антибиотик.

С другой стороны, среди провизоров всего 4,0% заявили, что покупатели всегда предъявляют рецепт на антибиотик; 44,5% предоставляют назначение врача. При этом 39,3% населения отметили, что аптечный работник всегда требует предъявления рецепта при покупке антибиотика, 51,8% иногда сталкиваются с этим требованием, а 8,9% никогда не предъявляют рецепт в аптеке.

Отметим, что 51,5% провизоров сталкиваются с ситуациями, когда покупатели не предъявляют рецепт на антибиотик. Когда речь заходит о причинах отсутствия рецепта, наиболее распространенными ответами являются: «Есть назначение от врача» (25,4%), «Я уже принимал такой антибиотик, мне помогло» (22,2%) и «Врач не выписал рецепт» (17,5%). Ответы, такие как «Я сам знаю, как лечить» (10,3%) и «Сосед подсказал» (6,3%), указывают на потенциальные риски самолечения и недостаточное понимание пациентами серьезности применения антибиотиков.

Сопоставляя данные опроса врачей и провизоров, можно отметить несоответствие между практикой назначения антибиотиков и их отпуска в аптеках. В ходе исследования выявлено, что 42,2% опрошенных врачей всегда выписывают рецепт на антибиотик, в то время как только 4,0% провизоров подтверждают, что покупатели всегда предъявляют рецепт. Это может быть связано с различными факторами, включая недостаточную информированность населения о важности рецептурного отпуска антибиотиков и несоблюдение правил выписки рецептов некоторыми врачами.

Результаты опроса подчеркивают необходимость усиления мер по информированию пациентов о важности правильного применения антибиотиков, а также повышения уровня сотрудничества между врачами, аптеками и населением в сфере рецептурного порядка выдачи данных препаратов. Только совместные усилия всех участников процесса назначения, отпуска и применения антибиотиков позволят снизить риски неправильного использования этих жизненно важных лекарственных средств и сохранить их эффективность в борьбе с бактериальными инфекциями.

Постоянное обновление знаний и углубление профессиональных компетенций позволяют специалистам эффективно и безопасно

применять современные методы диагностики и лечения. На заключительном этапе анкетирования установлено, что большинство врачей (77,8%) высоко оценивают актуальность обучения на дополнительных образовательных программах по антибиотикам, используемым в лечении инфекций нижних дыхательных путей. Интерес среди провизоров оказался еще выше — 85,2%. Такая высокая доля указывает на понимание специалистами важности постоянного обновления своих знаний. При этом 15,9% врачей не видят необходимости в таком обучении, в то время как среди провизоров этот показатель значительно ниже и составляет всего 7,4%. Это может говорить о том, что эти специалисты уже обладают достаточным объемом информации или же считают, что их текущая специализация не требует дополнительных знаний в этой области. Ответ «Не знаю» был дан 6,3% врачей и 7,4% провизоров, что показывает, что некоторая часть специалистов еще не определилась с необходимостью такого обучения.

ВЫВОДЫ

В результате исследования были выявлены предпочтения врачей, провизоров и населения в отношении выбора антибиотика для терапии инфекций нижних дыхательных путей, проблем антибиотикорезистентности, соблюдения правовых норм отпуска рецептурных препаратов, фармацевтического информирования. Основные выводы состоят в следующем.

1. Большая часть специалистов указала, что антибиотики для лечения инфекций нижних дыхательных путей назначаются «очень часто» ($\chi^2=0,09$; $p=0,764$).
2. Основными факторами, способствующими развитию антибиотикорезистентности, специалисты считают необоснованное назначение антибактериальных средств (21,0% врачей и 24,1% провизоров), слишком частые курсы антибиотикотерапии (17,2 и 21,5%), ошибки в выборе препарата (16,9% для обеих групп), ошибки в дозировании (14,5 и 12,8%) и низкий комплаенс (10,9 и 10,3%). Приверженность пациентов к лечению зависит от ряда факторов. Чаще всего врачи указывали доверие к врачу (15,1%), тогда как провизоры — частоту приема препарата (15,7%). Только 64,5% опрошенных пациентов соблюдают предписания врачей по длительности приема антибиотиков.
3. При выборе «идеального» антибиотика специалисты и население придают наибольшее

значение эффективности, безопасности и хорошей переносимости.

4. Подавляющее большинство медицинских специалистов подтверждают активный интерес пациентов к правилам приема антибиотиков, 85,0% врачей и 77,8% провизоров утверждают, что пациенты обращаются за этой информацией. В центре внимания пациентов находятся режим дозирования и частота приема.

5. Подавляющее большинство врачей (93,7%) и провизоров (83,0%) информируют пациентов о правилах приема антибиотиков. В основном специалисты тратят до 3 мин на объяснение пациентам правил приема антибиотиков: 37,1% врачей и 48,1% провизоров. Отмечается разница в подходах: большая доля врачей считает, что они уделяют до 5 мин разъяснению, в то время как большее количество провизоров ограничивается лишь 1 мин. При этом более 53% опрошенных обращаются к провизорам за консультацией, чаще всего при возникновении дополнительных вопросов по приему препаратов.

6. При выборе антибиотиков для детей специалисты и население чаще всего отмечают минимизацию риска аллергической реакции на сам антибиотик, удобство дозирования и наличие инструкции для расчета дозы. Среди лекарственных форм для детей наибольшую популярность имеет сироп благодаря его легкой дозируемости и приятному вкусу.

7. Отмечено, что только 42,2% врачей всегда выписывают рецепт на антибиотик; 53,3% провизоров сталкиваются с тем, что покупатели не предоставляют рецепт при покупке антибиотика. Только 55% посетителей аптек отмечают, что врач всегда выписывает рецепт при назначении антибиотика.

8. Большая часть медицинских специалистов активно стремится к повышению своей квалификации: 77,8% врачей и 85,2% провизоров выразили желание пройти дополнительное обучение по антибиотикам, используемым в лечении инфекций нижних дыхательных путей, подчеркивая тем самым понимание необходимости непрерывного профессионального роста.

Результаты данного социологического исследования могут быть положены в основу разработки рекомендаций по включению блока информации по антибиотикотерапии нижних дыхательных путей в образовательный процесс дополнительного профессионального обучения специалистов в сфере обращения лекарственных средств с целью повышения их компетентности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Дербенева МЛ, Гусева АЛ. Острые респираторные вирусные заболевания: современные подходы к диагностике и лечению. *Медицинский Совет*. 2019;(20):32–7. Derbeneva ML, Guseva AL. Acute respiratory viral diseases: Modern approaches to the diagnosis and treatment. *Medical Council*. 2019;(20):32–7 (In Russ.). <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-20-32-37>
2. Николаева СВ, Усенко ДВ, Шабалина СВ, Хлыповка ЮН, Феклисова ЛВ, Горелов АВ. Что нужно знать об антибактериальной терапии респираторных инфекций у детей. Правильный старт — успешный финиш. *Инфекционные болезни*. 2020;18(4):195–200. Nikolaeva SV, Usenko DV, Shabalina SV, Khlypovka YuN, Feklisova LV, Gorelov AV. What should we know about antibacterial therapy for respiratory infections in children. The right start ensures a successful finish. *Infectious Diseases*. 2020;18(4):195–200 (In Russ.). <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2020-4-195-200>
3. Синопальников АИ. Антибиотики и внебольничные инфекции нижних дыхательных путей. Кому? Какой? *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019;21(1):27–38. Sinopalnikov AN. Antibiotics and community-acquired lower respiratory tract infections. To whom? Which one? *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;21(1):27–38 (In Russ.). EDN: PWFHLK
4. Синопальников АИ. Внебольничные инфекции нижних дыхательных путей: подходы к рациональной антибактериальной терапии. *Болезни органов дыхания. Приложение к журналу Consilium Medicum*. 2017;(1):45–51. Sinopalnikov AN. Community-acquired infections of the lower respiratory tract: Approaches to rational antibiotic therapy. *Respiratory Diseases. Supplement to the Consilium Medicum*. 2017;(1):45–51 (In Russ.). EDN: ZSMBFN
5. Фесенко ОВ, Синопальников АИ, Янина АА, Токмулина ГМ. Рациональная антибактериальная терапия респираторных инфекций в реальной практике. *Доктор.Ру*. 2020;19(5):67–73. Fesenko OV, Sinopalnikov AI, Yanina AA, Tokmulina GM. Sustainable antibacterial management of respiratory infections in actual practice. *Doctor.Ru*. 2020;19(5):67–73 (In Russ.). <https://doi.org/10.31550/1727-2378-2020-19-5-67-73>
6. Стецюк ОУ, Андреева ИВ, Егорова ОА. Антибиотикорезистентность основных возбудителей ЛОР-заболеваний. *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2019;3(9–2):78–83. Stetsyuk OU, Andreeva IV, Egorova OA. Antibiotic resistance of the main ENT pathogens. *RMJ. Medical Review*. 2019;3(9–2):78–83 (In Russ.). EDN: ODVMFH
7. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*. 2015;109(7):309–18. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.00000000030>
8. Salam MA, Al-Amin MY, Salam MT, Pawar JS, Akhter N, Rabaan AA, Alqumber MAA. Antimicrobial resistance: A growing serious threat for global public health. *Healthcare (Basel)*. 2023;11(13):1946. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>
9. Орехов СН, Мохов АА, Яворский АН. Устойчивость к антимикробным средствам — фактор риска системы биобезопасности. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(3):336–47. Orekhov SN, Mokhov AA, Yavorsky AN. Antimicrobial resistance: A risk factor for the biosafety system. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(3):336–47 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-3-336-347>
10. Tang KWK, Millar BC, Moore JE. Antimicrobial resistance (AMR). *Br J Biomed Sci*. 2023;80:11387. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>
11. Орлова НВ. Антибиотикорезистентность и современная стратегия антибактериальной терапии. *Медицинский Совет*. 2022;(8):89–97. Orlova NV. Antibiotic resistance and modern strategy of antibacterial therapy. *Medical Council*. 2022;(8):89–97 (In Russ.). <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2022-16-8-89-97>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Р.И. Ягудина — концепция и план исследования; К.А. Копейка — анализ данных, подготовка текста рукописи; Д.Г. Карапетян, М.В. Проценко — сбор данных, подготовка текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Roza I. Yagudina conceptualised and designed the study. Kirill A. Kopeyka analysed data and drafted the manuscript. Diana G. Karapetyan and Marina V. Protsenko collected data and drafted the manuscript.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Ягудина Роза Исмаиловна, д-р фарм. наук, профессор / **Roza I. Yagudina**, Dr. Sci. (Pharm.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9080-332X>
Копейка Кирилл Андреевич / **Kirill A. Kopeyka**
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3581-0620>
Карапетян Диана Гамлетовна / **Diana G. Karapetyan**
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0075-1424>
Проценко Марина Валерьевна, канд. фарм. наук / **Marina V. Protsenko**, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9700-4881>

Поступила 29.08.2024

После доработки 23.12.2024

Принята к публикации 11.02.2025

Received 29 August 2024

Revised 23 December 2024

Accepted 11 February 2025



К.Е. Боровкова ✉ 

Формирование устойчивости микроорганизмов в эксперименте *in vitro*: метод адаптивной лабораторной эволюции (обзор)

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

✉ Боровкова Кристина Евгеньевна; borovkova.ke@doclinika.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Высокие темпы возникновения и распространения резистентности микроорганизмов к антибиотикам обуславливают необходимость быстрой разработки новых антибактериальных препаратов. Оценка способности микроорганизмов формировать устойчивость к разрабатываемым антибактериальным препаратам в контролируемых условиях *in vitro* позволяет экономить ресурсы при разработке и регистрации препарата, а также создавать наиболее эффективные препараты.

ЦЕЛЬ. Оценка возможности использования метода адаптивной лабораторной эволюции при изучении формирования устойчивости микроорганизмов.

ОБСУЖДЕНИЕ. Одним из методов оценки механизмов резистентности и выяснения влияния препаратов на эволюцию устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам является тест «Адаптивная лабораторная эволюция» (adaptive laboratory evolution – ALE). Исследования ALE проводятся в контролируемых условиях с длительным воздействием антибактериального агента на микроорганизмы. Постановка эксперимента ALE проводится различными способами путем серийного переноса микроорганизмов в жидкой среде, путем переноса колоний на чашках или непрерывным культивированием в хемостате. Протоколы ALE используются для развития устойчивости к различным антибактериальным агентам и требуют тщательного контроля условий эксперимента, которые могут повлиять на развитие устойчивости у микроорганизмов (концентрация антибактериального агента, количество последовательных пассажей, длительность инкубации и т.п.).

ВЫВОДЫ. Формирование устойчивости микроорганизмов может быть достигнуто при соблюдении следующих условий постановки теста ALE: использование антибактериального агента в субингибирующей или динамически увеличивающейся концентрации относительно минимальной подавляющей концентрации предкового штамма, выполнение определенного количества пассажей в течение 20 поколений и более, инкубация посевов до достижения стационарной фазы и т.п. Несмотря на то что эксперименты ALE являются достаточно длительными, данные исследования позволяют сократить потенциальный расход ресурсов при разработке соединения, производство которого может быть прекращено из-за развития резистентности.

Ключевые слова: антибиотики; антибактериальные препараты; резистентность; формирование устойчивости; адаптивная лабораторная эволюция; ALE

Для цитирования: Боровкова К.Е. Формирование устойчивости микроорганизмов в эксперименте *in vitro*: метод адаптивной лабораторной эволюции (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(1):24–33. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-656>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Kristina E. Borovkova ✉ 

Antimicrobial Resistance Development *In Vitro*: Adaptive Laboratory Evolution Method (Review)

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

✉ **Kristina E. Borovkova;** borovkova.ke@doclinika.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. High rates of emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) necessitate the rapid development of novel antibacterial medicinal products. The assessment of the microbial potential for AMR development under controlled conditions *in vitro* can save resources during drug development and marketing authorisation and contribute to creating the most effective medicinal products.

AIM. The aim was to determine the possibility of using the adaptive laboratory evolution (ALE) method to study the development of antimicrobial resistance.

DISCUSSION. A variety of methods can be used to investigate the mechanisms of AMR and the influence of medicinal products on the evolution of bacteria towards AMR. One of the options is the ALE method. ALE experiments are conducted under controlled conditions with prolonged exposure of microorganisms to an antibacterial agent. ALE experiments can include serial transfers of microorganisms to fresh liquid media or Petri dishes, as well as continuous cultivation of microorganisms in a chemostat. ALE protocols are used to develop resistance to different antibacterial agents and require meticulous control of the experimental conditions. To obtain reliable results in an experiment, it is necessary to identify parameters that may affect AMR development in microorganisms. These parameters include but are not limited to the concentration of the antibacterial agent, the number of consecutive passages, and the duration of incubation.

CONCLUSIONS. To achieve the necessary conditions for resistant microorganisms to form, it is essential to adhere strictly to ALE setup requirements, such as using antibacterial agents at subinhibitory or dynamically increasing concentrations (relative to the minimum inhibitory concentrations for the ancestral strain), performing a certain number of passages for ≥20 generations, and incubating cultures until the stationary phase. Despite the fact that ALE experiments are rather lengthy, these studies can reduce the potential waste of resources on developing new compounds that may have to be discontinued at the stage of production because of AMR development.

Keywords: antibiotics; antibacterial agents; antimicrobial resistance; AMR; resistance development; adaptive laboratory evolution; ALE

For citation: Borovkova K.E. Antimicrobial resistance development *in vitro*: Adaptive laboratory evolution method (Review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(1):24–33. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-656>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. The author declares no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Открытие антибиотиков в XX веке изменило подход к лечению инфекционных заболеваний и помогло спасти миллионы жизней, однако в результате постоянно растущего и неправильного использования антибиотиков появились микроорганизмы, проявляющие устойчивость по отношению к известным антибактериальным средствам [1–5]. Для возможного решения данной проблемы во многих регионах мира была принята стратегия сдерживания устойчивости к антибактериальным препаратам. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) разработала и опубликовала в 2001 г. схему процедур и мероприятий для замедления возникновения и снижения распространения резистентных микроорганизмов¹. В 2016 г. на сессии Генеральной ассамблеи ООН главы государств приняли «обязательство развернуть широкую и скоординированную деятельность по борьбе с антибиотикорезистентностью», что инициировало разработку национальных планов действий по решению данной проблемы. В 2017 г. в России была разработана «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года»². Принятие стратегий и планов подтверждает серьезность проблемы возникновения и распространения устойчивости микроорганизмов для всего человечества.

Эта проблема остается актуальной и на сегодняшний день, так как фармацевтические компании не успевают разрабатывать новые антибактериальные препараты в ответ на возникновение и быстрое распространение резистентности микроорганизмов. На увеличение темпов роста резистентности огромное влияние оказало неконтролируемое использование антибактериальных препаратов в сельском хозяйстве (для увеличения массы откармливаемых животных), а также в медицине — когда антибиотики назначаются не по показаниям и используются не по назначению [6]. Согласно прогнозам, ожидается, что через четверть века почти 100% бактерий будут устойчивы к большинству антибактериальных препаратов, используемых в медицине. Эксперты также прогнозируют, что число смертей из-за устойчивости к антибактериальным препаратам может вырасти до 10 млн к середине XXI века по сравнению с нынешним показателем (около 700 тыс. случаев) в год [7].

Для борьбы с возникновением и распространением резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам необходимо продолжать поиски новых антибактериальных агентов, способных обходить механизмы защиты бактериальной клетки. При выводе в обращение нового антибактериального препарата следует заранее знать о его преимуществах и возможных рисках, в том числе о том, как быстро может возникнуть и распространиться резистентность среди бактериальных патогенов. Эта информация полезна не только с точки зрения общественного здравоохранения, но и для фармацевтической промышленности, поскольку позволяет сократить потенциальный расход ресурсов при разработке соединения, производство которого может быть прекращено из-за развития резистентности.

Одним из методов, позволяющих оценить возможность возникновения устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам, является метод адаптивной лабораторной эволюции (adaptive laboratory evolution, ALE). Однако из-за сложности данного метода при постановке теста необходимо учитывать методологические особенности, позволяющие создать необходимые условия для формирования устойчивости микроорганизмов в лабораторных условиях *in vitro*.

Цель работы — оценка возможности использования метода адаптивной лабораторной эволюции при изучении формирования устойчивости микроорганизмов.

Материалом для исследования являлись источники отечественной и зарубежной научной литературы (научные журналы и публикации научных конференций) информационно-поисковых (PubMed, Google Scholar) и библиографических баз данных (eLIBRARY.RU, КиберЛенинка). В обзор включали публикации, доступные на 26.04.2024. В приоритете были статьи, опубликованные за последние 5 лет. Наиболее часто применяемые ключевые слова и выражения, используемые для поиска публикаций и информации: антибиотики, антибактериальные препараты, резистентность, формирование устойчивости, адаптивная лабораторная эволюция, исследование ALE, antibiotics, antibacterial agents, resistance, resistance development, adaptive laboratory evolution, ALE study.

¹ WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. Geneva: WHO; 2001.

² Распоряжение правительства Российской Федерации № 2045-р от 25.09.2017 «О стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Механизмы устойчивости бактерий

Устойчивость (резистентность) — одно из проявлений способности микроорганизмов адаптироваться к неблагоприятным условиям внешней среды. Под антибиотикорезистентностью подразумевают способность бактериальных возбудителей инфекционных болезней формировать устойчивость к антибактериальным препаратам [8]. Антибиотикорезистентность может быть природной (естественной) и приобретенной. Природная устойчивость является видовым признаком микроорганизма и характеризуется отсутствием мишени для конкретного антибактериального агента или ее недоступностью. Приобретенная устойчивость характеризуется способностью отдельных штаммов микроорганизмов выживать под действием антибактериальных препаратов в концентрациях, способных ингибировать основную часть бактериальной популяции данного вида³. Приобретенная устойчивость может возникать и распространяться в популяции бактерий в результате мутаций в генах, контролирующих синтез клеточных элементов, а также путем переноса генов [9]. Перенос генов антибиотикорезистентности между бактериями осуществляется за счет активности мобильных генетических элементов: способных самостоятельно перемещаться между бактериями (конъюгативные плазмиды и конъюгативные транспозоны), и способных перемещаться в пределах бактериальной клетки (по хромосоме, от хромосомы к плазмиде и наоборот: транспозоны, генные кассеты, интегроны и др.) [10]. Разнообразные механизмы горизонтального переноса генов среди даже филогенетически отдаленных видов бактерий способствовали возникновению множественной лекарственной устойчивости (полирезистентности) [11]. Данная проблема особенно значима для внутрибольничных инфекций, вызываемых так называемыми госпитальными штаммами³.

Действие антибактериальных препаратов может быть нейтрализовано по следующим механизмам (рис. 1) [1, 8, 10, 12]:

- ограничение поступления антибактериального препарата в клетку — барьер возникает за счет слоя липополисахарида оболочки клетки у грамотрицательных бактерий;
- активный отток антибактериального препарата (эффлюкс-механизм) — отток возникает за счет транспортных систем, обеспечивающих активное выведение экзогенных

веществ (в том числе и антибактериальных препаратов) из бактериальной клетки;

- инаktivация антибактериального препарата — путем фактической деградации (распада) молекулы препарата или его модификации;
- модификация мишени действия антибактериального препарата — в результате мутаций в кодирующих их генах или иных генетических событий, что может привести к снижению или утрате способности мишени связываться с антибактериальным препаратом.

Устойчивость бактерий может вырабатываться относительно всех известных антибактериальных препаратов, и, возможно, не все механизмы нейтрализации антибактериального действия изучены.

Методы оценки устойчивости

Существуют различные методы, позволяющие оценить возможность возникновения устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Одними из таких методов являются методы математического моделирования, направленные на построение вероятностных моделей возникновения и распространения резистентности в микробных популяциях. Математические модели распространения устойчивости чаще используются для обоснования мероприятий в области общественного здравоохранения по борьбе с инфекционными заболеваниями, особенно в контексте новых патогенов [13]. Оценка устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам

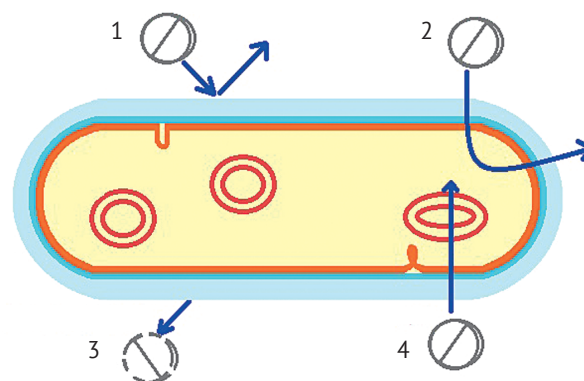


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the author

Рис. 1. Основные механизмы антибактериальной резистентности: 1 — ограничение поступления в клетку; 2 — эффлюкс-механизм; 3 — инаktivация; 4 — модификация мишени

Fig. 1. Main mechanisms involved in antimicrobial resistance: 1, reduced cell permeability; 2, efflux mechanism; 3, inactivation; 4, target modification

³ Зверев ВВ, Бойченко МН. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Учебник. Т. 1. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.

обычно проводится с использованием стандартизированных фенотипических методов. Молекулярные методы используются в дополнение к фенотипическим методам обнаружения генов резистентности [14].

На формирование резистентности могут существенно влиять пространственные или временные неоднородности концентрации антибактериальных агентов [15]. Для оценки пространственно-временной эволюции микроорганизмов был разработан метод, в котором используется экспериментальное устройство — пластина Microbial Evolution and Growth Arena (MEGA). Данное устройство представляет собой чашку с питательной средой с антибактериальным препаратом, концентрация которого градиентно увеличивается от центра к периферии. Чашку инокулируют подвижной бактерией «дикого типа», которая изначально не обладает устойчивостью к используемому антибактериальному препарату. Подвижные бактерии, инокулированные в одном месте на пластине, локально истощают питательные вещества, а затем распространяются посредством хемотаксиса в другие области. Только наиболее устойчивые мутанты могут распространяться в секции, содержащие антибактериальный агент в высокой концентрации. Воздействие на бактерии пространственными градиентами антибиотиков приводит к значительному повышению устойчивости путем последовательных адаптивных шагов в конкурирующих линиях [16, 17].

Для выявления новых механизмов резистентности и изучения влияния комбинаций и концентраций препаратов на эволюцию устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам наиболее часто используют подход ALE [18]. Суть адаптивной лабораторной эволюции заключается в длительном выращивании микроорганизмов в определенных условиях, часто при селективном давлении. Данный подход также используют для создания промышленных штаммов с желаемыми характеристиками [19].

Впервые об эксперименте ALE было сообщено в 1950-х годах. А. Novick и L. Szilard опубликовали результаты исследования по спонтанным мутациям бактерий, культивируемых в хемостате. В результате длительного культивирования чувствительного к бактериальному вирусу штамма микроорганизма происходили мутации, способствующие появлению более «приспособленного» к вирусу штамма [20]. В 1988 г. R. Lenski начал долгосрочный эксперимент по ALE на *Escherichia coli*, продолжающийся до сих пор.

Постановку эксперимента ALE проводят тремя различными способами (рис. 2) [21]:

- 1) серийный (последовательный) перенос — основан на повторении субкультивирования бактерий на свежей жидкой среде через регулярные промежутки времени;
- 2) перенос колоний — основан на повторении посева штрихами одной колонии на чашке с агаром на следующую чашку со свежим агаром;

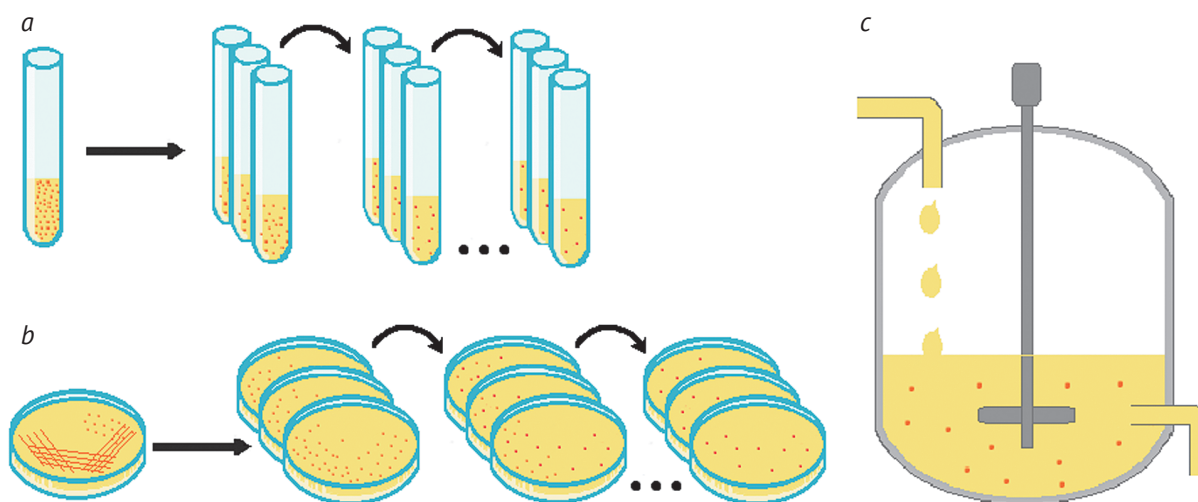


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the author

Рис. 2. Методы постановки эксперимента ALE (adaptive laboratory evolution): а — последовательный перенос в жидкой среде; б — перенос колоний; в — непрерывное культивирование

Fig. 2. Experimental setups for adaptive laboratory evolution (ALE): a, serial transfer in a liquid medium; b, colony transfer; c, continuous chemostat culture

3) непрерывное культивирование — культивирование в хемостате с использованием ферментера, данный метод позволяет контролировать темпы роста, плотность популяции клеток, поступление питательных веществ и условия окружающей среды.

Постановка теста серийным переносом культуры позволяет автоматизировать процесс и проводить высокопроизводительные эксперименты. Однако данный способ неприменим к клеткам, которые агрегируют или образуют биопленку в жидкой культуре. Рост культуры по своей природе прерывистый, и контроль условий роста часто ограничен и временен для данного способа. При постановке теста на твердых средах переносом колоний следует учитывать, что данный способ характеризуется низкой пропускной способностью и имеет ограничения в автоматизации. Контролировать условия роста также сложно из-за прерывистого характера роста культуры. Однако преимуществом данного способа является возможность визуализации эволюционной динамики с помощью агара. Для метода непрерывного культивирования основным преимуществом является возможность контролировать условия окружающей среды. Однако данный способ имеет ограничение многократного параллельного повторения из-за стоимости эксплуатации установки. Клетки также могут адаптироваться к биореакторам путем образования биопленки, предотвращающей вымывание [21].

Методологические особенности проведения исследования ALE

Для анализа адаптационных механизмов антибиотикорезистентности и (или) выделения антибиотикорезистентных клонов может быть использован метод серийного переноса. В исследованиях по данной методике применяют разные условия давления на отбор мутантных бактерий. Обычно используют два режима концентраций антибактериального агента: суб-МПК (субингибирующие) — концентрации ниже минимальной подавляющей концентрации (МПК) и динамически увеличивающиеся концентрации [18, 22]. Концентрации антибиотиков ниже МПК могут быть выбраны для получения низкого уровня резистентности микроорганизма, что в конечном итоге может привести к высокому уровню резистентности. Сообщалось, что несколько классов антибиотиков (таких как фторхинолоны, β -лактамы и аминогликозиды) на уровнях ниже МПК способны индуцировать SOS-ответ и общий

стрессорный ответ регулона RpoS в клетках бактерий, что может приводить к генетическим изменениям, включая перемещение мобильных элементов, которые могут нести детерминанты резистентности или вирулентности, и увеличение скорости мутагенеза во время репликации хромосом [23].

Концентрация антибиотиков напрямую изменяет силу отбора, который испытывают мутантные бактерии в эксперименте ALE, и, следовательно, влияет на качественный и количественный результат эксперимента. В исследованиях с увеличением концентрации антибактериального агента оказывается постоянно сильное давление отбора на бактерии. Скорость изменения окружающей среды является решающим параметром для вымирания популяции бактерий. Изменения окружающей среды, которые превышают адаптационные возможности организма или оставляют слишком мало времени для адаптации, обычно приводят к вымиранию. Следовательно, во избежание чрезмерной гибели микроорганизмов можно использовать более медленную скорость изменения окружающей среды либо большее количество повторов, чтобы компенсировать вымирание линии [22].

R. Vynchhi, Ch. Jena и N. Matange разработали протокол адаптивной лабораторной эволюции устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам для генетического и фенотипического анализа. Данный протокол описывает адаптивную лабораторную эволюцию устойчивости к антибактериальным препаратам на примере *Escherichia coli* K-12 MG1655 путем серийного пассирования штамма в питательной среде с добавлением антибиотиков. Этот протокол использовался для развития устойчивости к триметоприму, рифампицину, налидиксовой кислоте, спектиномицину и амоксициллину. В своем исследовании авторы использовали концентрации антибиотиков равные МПК/3, что, по мнению авторов, служит достаточным давлением для адаптивной лабораторной эволюции устойчивых к лекарствам бактерий. При использовании очень низких концентраций антибиотика может оказаться недостаточным давление отбора [18].

В исследовании по формированию устойчивости *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* к грамицидину С использовали антибактериальные агенты в концентрациях равных МПК и МПК/2 [24]. МПК антибактериального агента служит ориентиром для выбора концентраций

в исследованиях по формированию устойчивости, поэтому перед последовательными пассажами бактерий с антибактериальным агентом устанавливают МПК для предкового штамма. Для определения МПК наиболее часто используют культуральные методы, основанные на выявлении фенотипической устойчивости путем оценки роста бактерий в присутствии антибактериальных агентов. Такими методами являются разведение агара, градиентный тест, диффузия в агаре (метод дисков) и микроразведение в бульоне [25, 26].

Помимо выбора концентраций антибактериального агента, влияющих на отбор мутаций резистентности в популяции микроорганизмов, необходимо определить количество последовательных пассажей. Количество поколений, на которых необходимо провести эволюционный эксперимент, значительно влияет на результат экспериментов ALE. Стандартный эксперимент ALE по выделению устойчивых к препаратам бактерий может проводиться в течение 20–100 поколений, хотя для некоторых целей могут потребоваться более длительные эксперименты. Для эксперимента ALE можно использовать «узкое место» в пассаже в размере 0,1–10%, хотя чаще всего используется 1%, что приводит к 6–7 поколениям бактерий за цикл роста [18]. «Узкие места», то есть сокращение размера бактериальной популяции, приводят к усилению влияния случайных эффектов (генетического дрейфа) в ходе эволюции бактерий [27].

Также немаловажным фактором, влияющим на отбор мутантных бактериальных клеток, является длительность инкубации бактерий. 24-часовой цикл роста значительно упрощает проведение эксперимента и избавляет от необходимости пересевать культуры в нерабочее время. Однако это также приводит к длительной инкубации клеток в стационарной фазе. Стационарная фаза — это фаза роста бактериальной популяции, когда число жизнеспособных клеток достигает своего максимума, рост бактерий прекращается, но клетки при этом остаются метаболически активными. В период отсутствия роста бактерии экспрессируют гены, необходимые для их выживания. Формирование персистирующих клеток (формы покоящихся клеток) также приписывают генам, дифференциально экспрессирующимся в стационарной фазе. Персистирующие клетки устойчивы к воздействию антибиотиков и часто являются основной причиной лекарственной

устойчивости [28]. Таким образом, выбор продолжительности инкубации должен определяться на основании закономерности роста популяции бактериальных клеток. Определение скорости роста и времени до достижения стационарной фазы бактериальной культуры необходимо проводить перед началом эксперимента ALE.

Чтобы оценить надежность и стохастическую природу эволюционных изменений, в каждом эксперименте одновременно используют несколько независимых линий культур [29]. При каждом пассаже бактерий в среду, содержащую антибиотик, параллельно ведут пассажи бактериальных клеток в среду без антибиотика. Эти контрольные линии бактериальных клеток служат для выявления изменений, вызванных воздействием антибактериального препарата [18]. Многие типичные эксперименты по ALE были проведены во встряхиваемых колбах и аналогичных условиях выращивания с плотностью клеток 10^7 – 10^9 клеток/мл для типичных бактериальных культур [30]. Инкубацию посевов проводят в термостате при постоянном встряхивании для предотвращения оседания бактериальных клеток. После инкубации выращенные культуры повторно инокулируют в свежую среду с добавлением антибиотика в соответствующей концентрации, чтобы инициировать цикл роста 2 (или пассаж 2). Далее повторяют столько циклов роста, сколько необходимо для исследования.

При постановке теста с большим количеством повторов (>10) желательно использовать небольшие объемы культуры, 150–200 мкл, в 96-луночных планшетах. Для отслеживания генетических или фенотипических изменений бактерий в ходе исследования сохраняют часть культуры путем замораживания. При длительном исследовании возможно проводить замораживание каждые 10 пассажей или при каждом повышении концентрации антибиотика [18, 31]. В исследованиях с использованием 96-луночных планшетов возможно сохранение оставшихся клеток в лунках путем добавления в них глицерина до концентрации 20% и хранение планшетов при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ [22]. С сохраненными клетками проводят дальнейшие исследования по оценке формирования устойчивости. При обнаружении увеличения МПК в сравнении с предковым штаммом можно оценить стабильность выявленной устойчивости. Для этого проводят последовательные пассажи бактериальных клеток (с увеличенной МПК) в среду

без антибактериального агента, после чего определяют МПК для каждого пассажа. Таким образом, бактерии могут восстановить свою чувствительность к антибактериальному агенту до уровня концентрации, который наблюдался перед многократным воздействием антибактериального препарата на них [31].

Исходя из представленных данных по постановке теста методом адаптивной лабораторной эволюции (ALE), можно указать основные параметры (табл. 1), влияющие на результаты исследования формирования устойчивости микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из методов оценки формирования устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам является анализ адаптивной лабораторной эволюции (ALE). ALE предполагает длительное культивирование микроорганизмов в условиях селективного давления. Данный метод может использоваться для прогнозирования появления антибиотикоустойчивых мутантов в бактериальных популяциях. Исследования ALE являются достаточно трудоемкими и длительными. Не существует стандартизированных

процедур для проектирования и проведения экспериментов по адаптивной лабораторной эволюции.

Основными условиями, позволяющими получить надежные результаты при постановке эксперимента методом ALE, являются: определение МПК антибактериального агента к предковому штамму культуральными методами; использование субингибирующих или динамически увеличивающихся концентраций антибактериального агента относительно МПК; ведение нескольких независимых линий культур для определения надежности и стохастической природы эволюционных изменений; инкубация бактерий с антибактериальным агентом до достижения стационарной фазы; использование определенного количества пассажей в течение 20 поколений и более; сохранение части культур в ходе исследования путем замораживания для отслеживания генетических или фенотипических изменений. Таким образом, поскольку эксперименты ALE основаны на долгосрочном культивировании, они должны быть тщательно разработаны и подготовлены с учетом целей исследований.

Таблица 1. Ключевые условия метода адаптивной лабораторной эволюции (ALE)

Table 1. Key conditions of the adaptive laboratory evolution (ALE) method

Параметры <i>Parameters</i>	Характеристики <i>Characteristics</i>
Определение МПК антибактериального агента <i>Determination of the MIC of the antibacterial agent</i>	Устанавливают МПК антибактериального агента для предкового штамма культуральными методами <i>The MIC of the antibacterial agent is determined for the ancestral strain using culture techniques</i>
Концентрация антибактериального агента <i>Antibacterial agent concentrations</i>	Используют субингибирующие или динамически увеличивающиеся относительно МПК концентрации <i>The experiment uses sub-inhibitory or dynamically increasing concentrations relative to the MIC</i>
Определение достоверности и стохастической природы эволюционных изменений <i>Determination of the reliability and stochastic nature of evolutionary changes</i>	Одновременное ведение нескольких независимых линий культур <i>Multiple parallel independent cultures are maintained</i>
Длительность инкубации бактерий с антибактериальным агентом <i>Duration of incubation of bacteria with the antibacterial agent</i>	До достижения стационарной фазы <i>Incubation lasts until the stationary phase is reached</i>
Количество последовательных пассажей <i>Number of consecutive passages</i>	В течение 20–100 поколений, для некоторых целей могут потребоваться более длительные эксперименты <i>Cultures are passaged for 20–100 generations; longer experiments may be required for some purposes</i>
Отслеживание генетических или фенотипических изменений культуры <i>Monitoring of genetic or phenotypic changes in culture</i>	Сохранение части культур в ходе исследования путем замораживания <i>Portions of cultures are preserved during research by freezing</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the author

Примечание. МПК — минимальная подавляющая концентрация.

Note. MIC, minimum inhibitory concentration.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Salam MA, Al-Amin MY, Salam MT, Pawar JS, Akhter N, Rabaan AA, et al. Antimicrobial resistance: A growing serious threat for global public health. *Healthcare (Basel)*. 2023;11(13):1946. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>
2. Endale H, Mathewos M, Abdeta D. Potential causes of spread of antimicrobial resistance and preventive measures in one health perspective — a review. *Infect Drug Resist*. 2023;16:7515–45. <https://doi.org/10.2147/IDR.S428837>
3. Ayukekbong JA, Ntemgwa M, Atabe AN. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6:47. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0208-x>
4. Watkins RR, Bonomo RA. Overview: Global and local impact of antibiotic resistance. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(2):313–22. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.001>
5. Collaborators AR. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
6. Намазова-Баранова ЛС, Баранов АА. Антибиотикорезистентность в современном мире. *Педиатрическая фармакология*. 2017;14(5):341–54. Namazova-Baranova LS, Baranov AA. Antibiotic resistance in modern world. *Pediatric Pharmacology*. 2017;14(5):341–54 (In Russ.). <https://doi.org/10.15690/pf.v14i5.1782>
7. Halawa EM, Fadel M, Al-Rabia MW, Behairy A, Nouh NA, Abdo M, et al. Antibiotic action and resistance: Updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance. *Front Pharmacol*. 2024;14:1305294. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1305294>
8. Сидоренко СВ, Тишков ВИ. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам. *Успехи биологической химии*. 2004;44:263–306. Sidorenko SV, Tishkov VI. Molecular bases of resistance to antibiotics. *Advances in Biological Chemistry*. 2004;44:263–306 (In Russ.).
9. Peterson E, Kaur P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front Microbiol*. 2018;9:2928. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
10. Супотницкий МВ. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2011;(2):4–13. Supotnitskiy MV. Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria. *Biopreparats (Biopharmaceuticals)*. 2011;(2):4–13 (In Russ.). EDN: RDTUFZ
11. Землянко ОМ, Рогоза ТМ, Журавлева ГА. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам. *Экологическая генетика*. 2018;16(3):4–17. Zemlyanko OM, Rogozha TM, Zhouravleva GA. Mechanisms of bacterial multiresistance to antibiotics. *Ecological Genetics*. 2018;16(3):4–17 (In Russ.). <https://doi.org/10.17816/ecogen1634-17>
12. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*. 2018;4(3):482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
13. Niewiadomska AM, Jayabalasingham B, Seidman JC, Willem L, Grenfell B, Spiro D, et al. Population-level mathematical modeling of antimicrobial resistance: A systematic review. *BMC Med*. 2019;17(1):81. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1314-9>
14. Anjum MF, Zankari E, Hasman H. Molecular methods for detection of antimicrobial resistance. *Microbiol Spectr*. 2017;5(6):10. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0011-2017>
15. Steel H, Papachristodoulou A. The effect of spatiotemporal antibiotic inhomogeneities on the evolution of resistance. *J Theor Biol*. 2020;486:110077. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.110077>
16. Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED, Chait R, Gross R, Yelin I, et al. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science*. 2016;353(6304):1147–51. <https://doi.org/10.1126/science.aag0822>
17. Kleinman A. The Kishony mega-plate experiment, a Markov process. *bioRxiv*. 2021;474071. <https://doi.org/10.1101/2021.12.23.474071>
18. Vinchi R, Jena C, Matange N. Adaptive laboratory evolution of antimicrobial resistance in bacteria for genetic and phenotypic analyses. *STAR Protoc*. 2023;4(1):102005. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.102005>
19. Дебабов ВГ. Современные подходы к созданию промышленных штаммов микроорганизмов. *Генетика*. 2015;51(4):365–76. <https://doi.org/10.7868/S0016675815040049> Debabov VG. Modern approaches to the creation of industrial microorganism strains. *Russian Journal of Genetics*. 2015;51(4):365–76. <https://doi.org/10.1134/S1022795415040043>
20. Novick R, Szilard L. Experiments with the Chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1950;36(12):708–19. <https://doi.org/10.1073/pnas.36.12.708>
21. Hirasawa T, Maeda T. Adaptive laboratory evolution of microorganisms: Methodology and application for bioproduction. *Microorganisms*. 2023;11(1):92. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010092>
22. Jahn LJ, Munck C, Ellabaan MMH, Sommer MOA. Adaptive laboratory evolution of antibiotic resistance using different selection regimes lead to similar phenotypes and genotypes. *Front Microbiol*. 2017;8:816. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00816>
23. Li J, Xie S, Ahmed S, Wang F, Gu Y, Zhang C, et al. Antimicrobial activity and resistance: influencing factors. *Front Pharmacol*. 2017;8:364. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00364>
24. Гуров АВ, Боровкова КЕ, Крышень КЛ, Никифорова ЛР, Салмова ЮВ. Оценка бактерицидной активности грамицидина С в отношении клинических изолятов *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* при однократном и многократном воздействии. *Антибиотики и химиотерапия*. 2022;67(7–8):8–18. Gurov AV, Borovkova KE, Kryshen KL, Nikiforova LR, Salnova JV. Evaluation of the bactericidal activity of Gramicidin S against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* clinical isolates with single and multiple exposure. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2022;67(7–8):8–18 (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-8-18>
25. Kaprou GD, Bergšpica I, Alexa EA, Alvarez-Ordóñez A, Prieto M. Rapid methods for antimicrobial resistance diagnostics. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(2):209. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020209>
26. Guliy OI, Evstigneeva SS, Karavaeva OA. Antimicrobial resistance and current methods for its detection. *Front Biosci Elite*. 2023;15(3):19. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1503019>

27. Mahrt N, Tietze A, Künzel S, Franzenburg S, Barbosa C, Jansen G, et al. Bottleneck size and selection level reproducibly impact evolution of antibiotic resistance. *Nat Ecol Evol.* 2021;5(9):1233–42.
<https://doi.org/10.1038/s41559-021-01511-2>
28. Jaishankar J, Srivastava P. Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Front Microbiol.* 2017;8:2000.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02000>
29. Maeda T, Furusawa C. Laboratory evolution of antimicrobial resistance in bacteria to develop rational treatment strategies. *Antibiotics (Basel).* 2024;13(1):94.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics13010094>
30. Dragosits M, Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microb Cell Fact.* 2013;12:64.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-64>
31. Hong J, Hu J, Ke F. Experimental induction of bacterial resistance to the antimicrobial peptide tachyplesin I and investigation of the resistance mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(10):6067–75.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00640-16>

Вклад авторов. Автор подтверждает соответствие своего авторства критериям ICMJE.

Authors' contributions. The author confirms that she meets the ICMJE criteria for authorship.

ОБ АВТОРЕ / AUTHOR

Боровкова Кристина Евгеньевна / Kristina E. Borovkova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1571-6549>

Поступила 06.05.2024

После доработки 08.07.2024

Принята к публикации 21.08.2024

Online first 09.10.2024

Received 6 May 2024

Revised 8 July 2024

Accepted 21 August 2024

Online first 9 October 2024



С.И. Кулешова ✉
И.А. Денисова
Т.И. Пшеничных

Оценка стабильности растворов антибиотиков-цефалоспоринов по показателям «Цветность раствора» и «Примеси»

*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*

✉ Кулешова Светлана Ивановна; Kuleshova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Цефалоспориновые антибиотики применяют в виде лекарственных форм для инъекций, как правило, без добавления вспомогательных веществ. Анализ по показателям «Примеси» и «Цветность раствора» позволяет оценить процессы деструкции активной фармацевтической субстанции (АФС) в таких препаратах и поэтому является важным для контроля их надлежащего качества.

ЦЕЛЬ. Оценить стабильность водных растворов цефалоспоринов по показателям «Примеси» и «Цветность раствора» и проследить взаимосвязь между этими показателями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Объектами исследования были АФС цефазолин, цефуроксим, цефтриаксон и смесь цефтриаксона с сульбактамом (2:1). Интенсивность окраски водных растворов антибиотиков оценивали по сравнению с эталонами цветности и спектрофотометрически при 430 нм для 10% раствора цефазолина в течение 6 сут, при 450 нм для 1,2% растворов цефтриаксона и смеси цефтриаксона с сульбактамом в течение 11 и 16 сут соответственно. Одновременно методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определяли содержание родственных примесей в растворах цефазолина (10 и 0,25%), цефтриаксона (1,2 и 0,03%), смеси цефтриаксона и сульбактама (1,2% по цефтриаксону). Примеси растворов цефтриаксона исследовали в течение 16 сут, растворов цефуроксима (10 и 0,1%) в течение 2 сут. Все экспериментальные растворы хранили при комнатной температуре и естественном освещении, исключив попадание прямых солнечных лучей.

РЕЗУЛЬТАТЫ. В процессе эксперимента все исследуемые растворы приобретали более интенсивную желтую окраску, увеличивались значения оптических плотностей и содержание родственных примесей. Деструкция в разбавленных растворах цефазолина, цефтриаксона и цефуроксима проходила интенсивнее, чем в растворах более высокой концентрации. Отмечено преимущественное увеличение содержания одной-двух примесей в течение 24–96 ч при незначительном изменении содержания других родственных соединений. Наименее стабильным в водном растворе был цефуроксим, через 24 ч содержание примеси дезкарбомилцефуроксима превысило нормативные требования в 2,5 раза. Цветность 1,2% раствора цефтриаксона превысила нормативные требования через 24 ч хранения, содержание единичной примеси — через 72 ч.

ВЫВОДЫ. Стабильность водных растворов цефалоспориновых антибиотиков по показателям «Цветность раствора» и «Примеси» зависит от химического строения вещества, концентрации растворов и длительности их хранения при естественном освещении. Отмечена взаимосвязь между значениями оптической плотности и увеличением количества отдельных примесей в растворах цефазолина и цефтриаксона.

Ключевые слова: цефазолин; цефтриаксон; цефуроксим; оптическая плотность; цефалоспорины; цветность раствора; родственные примеси; стабильность; антибиотики; контроль качества; антибактериальные средства

Для цитирования: Кулешова С.И., Денисова И.А., Пшеничных Т.И. Оценка стабильности растворов антибиотиков-цефалоспоринов по показателям «Цветность раствора» и «Примеси». *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(1):34–43. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-34-43>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Svetlana I. Kuleshova ✉, 
Irina A. Denisova, 
Tatiana I. Pshenichnykh 

Stability of Cephalosporins in Solution in Terms of the Colour of Solution and Impurities

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

✉ Svetlana I. Kuleshova; Kuleshova@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Cephalosporins are injectable antibiotics, which are mainly free from excipients. Testing for impurities (degradation products) and the colour of solution can help evaluate degradation processes in cephalosporin active substances. Therefore, such testing is important for the quality control of cephalosporins.

AIM. This study aimed to evaluate the stability of cephalosporins in aqueous solutions in terms of impurities and the colour of solution and explore the relationship between these quality parameters.

MATERIALS AND METHODS. This study focused on cephalosporin active substances, including cefazolin, cefuroxime, ceftriaxone, and a combination of ceftriaxone and sulbactam (2:1). The colour intensity of aqueous solutions of these antibiotics was examined by visual comparison with reference standards and by spectrophotometry. The absorbance values of 10% cefazolin solution were measured at 430 nm at fixed intervals for 6 days, and those of 1.2% ceftriaxone and ceftriaxone–sulbactam solutions were determined at the maximum absorption wavelength of 450 nm for 11 days and 16 days, respectively. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the content of related substances in solutions of cefazolin (10% and 0.25%), ceftriaxone (1.2% and 0.03%), and the ceftriaxone–sulbactam combination (1.2%, calculated as ceftriaxone). Ceftriaxone solutions were studied for 16 days, and cefuroxime solutions (10% and 0.1%) were studied for 2 days (48 hours). All the test solutions were stored at room temperature in natural light (away from direct sunlight).

RESULTS. During the test period, all the test solutions gradually acquired an intense yellow colour, and their absorbance and related substance content increased accordingly. Diluted solutions of cefazolin, ceftriaxone, and cefuroxime degraded significantly faster than the solutions of these antibiotics of a higher concentration. The experiment showed that the content of only one or two impurities increased during the first 24–96 hours of degradation, while the content of the remaining related substances changed insignificantly. Cefuroxime proved to be the least stable in aqueous solutions; the content of dezarbomoyl cefuroxime exceeded the limit specified by the regulatory requirements by 2.5 times after 24 hours of storage. The colour of 1.2% ceftriaxone deviated from the regulatory requirements after 24 hours, and the content of individual impurities exceeded the applicable limit for after 72 hours.

CONCLUSIONS. The study has shown that the stability of cephalosporins in aqueous solutions in terms of impurities and the colour of solution depends on the chemical structure of the substance, the concentration of the solution, and the duration of storage in natural light. A correlation has been demonstrated between the absorbance of cefazolin and ceftriaxone solutions and the content of individual impurities.

Keywords: cefazolin; ceftriaxone; cefuroxime; absorbance; cephalosporins; colour of solution; related substances; stability; antimicrobials; quality control

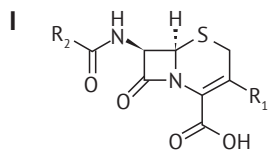
For citation: Kuleshova S.I., Denisova I.A., Pshenichnykh T.I. Stability of cephalosporins in solution in terms of the colour of solution and impurities. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(1):34–43. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-34-43>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022300127-0).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Цефалоспориновые антибиотики — это большая группа β -лактамов, производство и применение которых в медицинской практике в широких масштабах началось с 70-х годов XX века¹. Для получения полусинтетических антибиотиков в общее ядро молекулы цефалоспоринов — 7-аминоцефалоспоровую кислоту (7-АЦК) (I) путем направленного химического или биокаталитического синтеза вводят функциональные группы, в основном в положении R_2 и R_1 ² [1, 2]. Модификация структуры 7-АЦК приводит к изменению антибактериального спектра получаемых соединений, их фармакологических и физико-химических свойств³ [2].



Выделяют пять поколений (генераций) антибиотиков цефалоспоринов. К первому поколению относится цефалотин, цефазолин, цефалексин, цефадроксил. Примерами 2-го поколения являются цефуроксим, цефаклор, 3-го поколения — цефотаксим, цефтриаксон. К 4-й генерации относят цефепим и цефпиром; 5-я генерация пока представлена только цефтралином. Если цефалоспорины первого поколения эффективны в основном против грамположительных бактерий, появление последующих генераций цефалоспоринов было связано с расширением спектра их действия против аэробных грамотрицательных бактерий⁴.

Для большинства антибиотиков, относящихся к первым трем поколениям, в Фармакопее США

2024 года, Европейской фармакопее 11.3 (Ph. Eur.) и в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) XV изд. представлены монографии, регламентирующие стандарты качества соответствующих соединений в случае их использования в качестве активных фармацевтических субстанций (АФС). Обязательными показателями качества АФС, особенно если они предназначены для производства парентеральных лекарственных средств, являются «Примеси» и «Цветность раствора». Для проявления биологической активности цефалоспоринов большое значение имеет целостность β -лактамового кольца, неустойчивого в кислой и щелочной среде [3, 4]. В водных растворах цефалоспорины также подвергаются деструкции с возможным расщеплением β -лактамового кольца [3–5]. Стабильность растворов цефалоспоринов зависит от температуры, pH, воздействия света. Было показано, что в течение суток цефалоспорины в водных растворах гидролизуются⁵. Анализ степени деструкции цефалоспоринов в водных растворах с течением времени при естественном освещении и взаимосвязь процесса постепенной деградации с изменением качества этих препаратов и их соответствием фармакопейным требованиям в литературе не описаны. При этом наблюдаемое постепенное увеличение интенсивности окрашивания растворов при работе с этими антибиотиками свидетельствует о накоплении продуктов разложения действующего вещества.

Цель работы — оценить стабильность водных растворов цефалоспоринов по показателям «Примеси» и «Цветность раствора» и проследить взаимосвязь между этими показателями.

¹ Страчунский ЛС, Белоусов ЮБ, Козлов СН, ред. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. М.: 2007. Яковлев ВП, Яковлев СВ, ред. Рациональная антимикробная фармакотерапия: руководство. М.: Литтерра; 2007.

² Егоров НС. Основы учения об антибиотиках: учебник. М.: Наука; 2004.

Раменская ГВ, ред. Фармацевтическая химия: учебник. М.: Лаборатория знаний; 2021.

³ Яковлев ВП, Яковлев СВ, ред. Рациональная антимикробная фармакотерапия: руководство. М.: Литтерра; 2007.

⁴ Егоров НС. Основы учения об антибиотиках: учебник. М.: Наука; 2004.

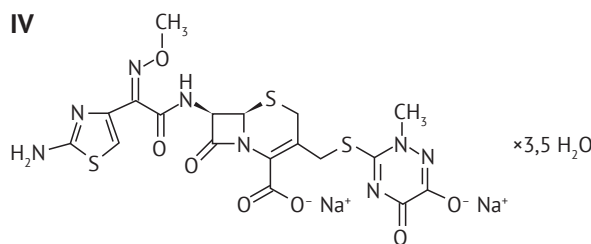
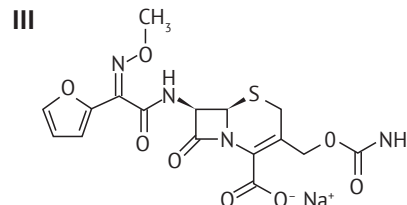
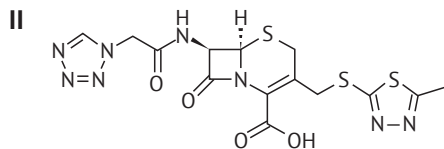
⁵ Страчунский ЛС, Белоусов ЮБ, Козлов СН, ред. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. М.: 2007. Яковлев ВП, Яковлев СВ, ред. Рациональная антимикробная фармакотерапия: руководство. М.: Литтерра; 2007.

Егоров НС. Основы учения об антибиотиках: учебник. М.: Наука; 2004.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве **объектов исследования** были выбраны АФС, зарегистрированные в Российской Федерации: цефазолин (II), цефуроксим (III), цефтриаксон (IV), а также смесь цефтриаксона

с сульбактамом (2:1). Эти три антибиотика легко растворимы в воде и используются в форме натриевых солей для приготовления инъекционных препаратов.



Цефазолин (6R,7R)-3-[[[5-метил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)сульфанил]метил]-8-оксо-7-[2-(1H-тетразол-1-ил)ацетидами]-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоксилат⁶ относится к первому поколению соединений цефалоспоринов ряда с гетероциклическим заместителем (R₂). Характеризуется как белый или почти белый порошок, очень гигроскопичен⁷. Цефуроксим (6R,7R)-3-[[[карбамоилокси]метил]-7-[(2Z)-2-(метоксиимино)-2-(фуран-2-ил)ацетидами]-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоксилат⁸ — антибиотик второго поколения с негетероциклическим заместителем (R₂). Белый или почти белый порошок⁹. Цефтриаксон (6R,7R)-7-[(Z)-2-(2-амино-4-тиазолил)-2-(метоксиимино)ацетидами]-3-[[[2-метил-6-оксидо-5-оксо-2,5-дигидро-1,2,4-триазин-3-ил)сульфанил] метил]-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоксилат динатрия гидрат (1:3,5)¹⁰ относится к третьей генерации с гетероциклическим заместителем (R₂), представляет собой гидратную форму молекулы¹¹. Белый, почти белый или желтоватый кристаллический порошок¹².

Смесь цефтриаксона с сульбактамом (2:1) легко растворима в воде. Сульбактам в составе препарата¹³ является ингибитором пенициллиназы и также представляет собой β-лактажное соединение.

Для **оценки изменения интенсивности окраски** водных растворов цефалоспоринов применяли два фармакопейных метода: визуальный и спектрофотометрический. Использование инструментального метода позволяет получить количественную и более объективную оценку, чем визуальный способ.

Оптическую плотность 10% раствора цефазолина измеряли при длине волны 430 нм согласно требованиям Ph. Eur., 1,2% раствора цефтриаксона и раствора смеси цефтриаксона (1,2%) и сульбактама — в максимуме поглощения при длине волны 450 нм. Выбор концентраций испытуемых растворов соответствовал требованиям Ph. Eur. и ГФ РФ для анализа исследуемых АФС. Анализ смеси было решено проводить аналогично цефтриаксону. При анализе визуальным

⁶ ФС.2.1.0315 Цефазолин натрия. Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. Т. 2. М.; 2023.

⁷ 04/2019:0988 Cefazolin sodium. European Pharmacopoeia 11.6.

ФС.2.1.0315 Цефазолин натрия. Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. Т. 2. М.; 2023.

⁸ ФС.2.1.0688 Цефуроксим натрия. Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. Т. 2. М.; 2023.

⁹ 01/2008:0992 Cefuroxime sodium. European Pharmacopoeia 11.6.

ФС.2.1.0688 Цефуроксим натрия. Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. Т. 2. М.; 2023.

¹⁰ ФС.2.1.025 Цефтриаксон натрия. Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. Т. 2. М.; 2023.

¹¹ Яковлев ВП, Яковлев СВ, ред. Рациональная антимикробная фармакотерапия: руководство. М.: Литература ; 2007.

Егоров НС. Основы учения об антибиотиках: учебник. М.: Наука; 2004.

Раменская ГВ, ред. Фармацевтическая химия: учебник. М.: Лаборатория знаний; 2021.

¹² 01/2009:0991 Ceftriaxone sodium. European Pharmacopoeia 11.6.

ФС.2.1.025 Цефтриаксон натрия. Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. Т. 2. М.; 2023.

¹³ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

методом использовали фармакопейные эталоны цветности¹⁴.

Оптическую плотность растворов антибиотиков измеряли на спектрофотометре Agilent 8453, pH — на приборе Mettler Toledo тип Seven Compact, для определения содержания родственных примесей использовали хроматограф Agilent Infinity 1260. Измерения проводили через определенные промежутки времени с использованием одних и тех же растворов. Дополнительно с такой же периодичностью изучали стабильность растворов указанных антибиотиков по содержанию родственных примесей. Концентрации растворов были выбраны в соответствии с требованиями нормативных документов для анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) — 0,25% цефазолина, 0,1% цефуроксима и 0,03% цефтриаксона. Все исследуемые растворы хранили при комнатной температуре 22–24 °С при естественном освещении, исключив попадание прямых солнечных лучей. Антибиотики растворяли в свежеприготовленной воде очищенной и хранили в плотно закупоренных конических колбах.

Содержание примесей оценивали методом внутренней нормализации в процентах с учетом относительного времени удерживания. Единичные примеси идентифицировали, если такая возможность была предусмотрена методикой. Пики растворителей, реактивов и пики, обусловленные компонентами подвижной фазы, в расчет не принимали.

Использовали методики ВЭЖХ, описанные в монографиях Ph. Eur. на цефуроксим натрия и цефтриаксон натрия с незначительными изменениями, определение примесей в растворах цефазолина проводили согласно требованиям Фармакопеи США¹⁵. Условия хроматографирования для определения примесных продуктов:

- цефазолин — подвижная фаза (ПФ) двухкомпонентная (ПФ А — буферный раствор с pH 6,8, ПФ В — ацетонитрил), градиентное элюирование в течение 65 мин, скорость потока 1,5 мл/мин, детектирование при 254 нм и 210 нм, температура колонки 30 °С, объем вводимой пробы 20 мкл, колонка Luna C18 250×4,6 мм, 5 мкм;
- цефуроксим — ПФ ацетонитрил и ацетатный буферный раствор с pH 3,4 в соотношении 1:99, скорость потока 1,0 мл/мин,

детектирование при 273 нм, температура колонки 30 °С, объем вводимой пробы 20 мкл, колонка Spherisorb C6 100×4,6 мм, 5 мкм.

- цефтриаксон — ПФ буферный раствор с pH 6,0 и ацетонитрил в соотношении 1:1, скорость потока 1,5 мл/мин, детектирование при 254 нм, температура колонки 30 °С, объем вводимой пробы 20 мкл, колонка Luna C18 250×4,6 мм, 5 мкм.

Статистическую обработку результатов в данном исследовании не проводили.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе работы все исследуемые растворы цефалоспоринов постепенно приобретали более интенсивную желтую окраску по сравнению с первоначальным цветом. Раствор цефтриаксона (1,2%) в начале опыта выдерживал сравнение с эталоном цветности Y_5 , что соответствует нормативным требованиям монографии на цефтриаксон натрия¹⁶, через 24 ч хранения на свету приобретал выраженный желтый цвет (эталон Y_4), через 144 ч (6 сут) соответствовал эталону Y_3 . Раствор смеси цефтриаксона с сульбактамом с той же концентрацией цефтриаксона существенно изменял окраску в течение 24 ч от Y_4 до Y_3 с последующим пожелтением раствора на конечном этапе эксперимента до соответствия эталону Y_2 . Окраска 10% раствора цефазолина первоначально не превышала эталон Y_3 , через 24 ч соответствовала эталону Y_2 , и далее в процессе наблюдений цветность раствора практически менялась.

Визуальная оценка цветности 10% раствора цефуроксима в сравнении с эталонами была затруднена, так как интенсивность окраски раствора сразу после его приготовления уже превышала эталон 1 шкалы цветности BY.

В монографиях Ph. Eur. и ГФ РФ на исследуемые соединения только для цефтриаксона натрия предусмотрено сравнение с эталоном для оценки цветности раствора. Внешний вид растворов 10% раствора цефазолина стандартизуют по значению оптической плотности — «не более 0,15».

Для исследуемых растворов цефазолина в течение 16 сут, цефтриаксона и смеси цефтриаксона с сульбактамом в течение 11 сут наблюдали увеличение оптической плотности при хранении на свету (рис. 1). Наиболее стабильным соединением в условиях испытания по показателю «Цветность раствора» оказался цефазолин.

¹⁴ ОФС.1.2.1.006 Степень окраски жидкостей. Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. Т. 1. М.; 2023.

¹⁵ Cefazolin sodium. United States Pharmacopeia. USP NF; 2024.

¹⁶ 01/2009:0991 Ceftriaxone sodium. European Pharmacopeia 11.6.

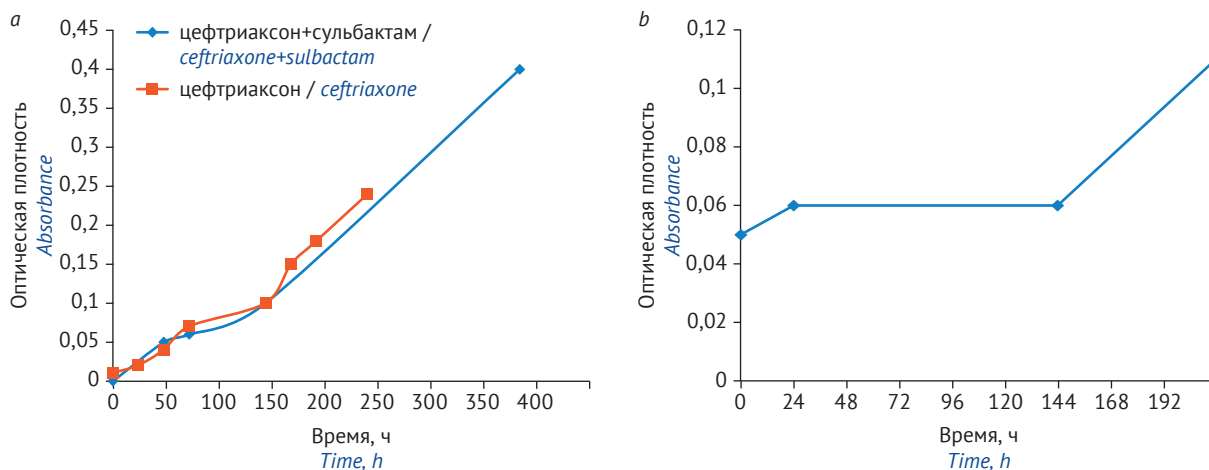


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Изменение оптической плотности 1,2% раствора цефтриаксона, 1,2% раствора цефтриаксона с сульбактамом (а) и 10% раствора цефазолина (б) в процессе хранения при комнатной температуре на свету без доступа прямых солнечных лучей

Fig. 1. Changes in the absorbance of 1.2% solutions of ceftriaxone and ceftriaxone-sulbactam (a) and 10% solution of cefazolin (b) during storage at room temperature in natural light (away from direct sunlight)

Оптическая плотность 10% раствора цефазолина через 9 сут (216 ч) наблюдения не превышала установленное¹⁷ предельное значение 0,15.

Считается, что водные растворы натриевых солей цефалоспоринов обладают буферными свойствами [6]. Наблюдения за динамикой изменения pH показали, что исследуемые растворы цефтриаксона с сульбактамом и цефазолина имели слабокислую реакцию с постепенным сдвигом в щелочную. Так, pH раствора цефтриаксона с сульбактамом изменялся от 6,4 в начале эксперимента до 6,9 в конце испытаний, pH раствора цефазолина — от 6,0 до 6,8 соответственно, последнее значение превысило нормативные требования¹⁸ («от 4,0 до 6,0» для 10% раствора цефазолина натрия). Диапазон изменений pH раствора цефтриаксона был шире и составил от 6,6 до 7,5, тем не менее эти значения не превышали нормативные пределы («от 6,0 до 8,0»)¹⁹. Возможно, что в процессе хранения растворов цефалоспоринов образуются продукты деструкции, обладающие щелочными свойствами.

Оценивая полученные результаты анализа по показателю «Цветность раствора», представляется интересным проследить изменения содержания родственных примесей (продуктов деструкции) в растворах цефалоспориновых антибиотиков.

При анализе результатов деструкции цефазолина в 10 и 0,25% водных растворах показано (рис. 2), что сумма примесей превышала нормативные требования (3,5%)²⁰ через 96 ч (4 сут), а через 6 сут составила более 5%. Суммарное содержание примесей в исследуемых объектах может увеличиваться в результате образования как одной, так и одновременно нескольких примесей.

Процесс деструкции не отличался в растворах разных концентраций — увеличивалось содержание в основном двух примесей: тетразолацетамида (V) (N-(2,2-дигидроксиэтил)-2-(1H-тетразол-1-ил)ацетамид)²¹ и цефазолина с открытым лактонным кольцом или 3-гидроксиметил цефазолина (VI) (6R,7R)-7-[2-(1H-тетразол-1-ил)ацетамидо]-3-(гидроксиметил)-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоксикислота)²². Тогда как содержание примеси цефазолина лактона (N-{{5aR,6R}-1,7-диоксо-1,3,4,5a,6,7-гексагидроазето[2,1-b]фуоро[3,4-d][1,3]тиазин-6-ил}-2-(1H-тетразол-1-ил)ацетамид)²³ в исследуемых растворах уменьшалось. Это отчасти объясняет увеличение содержания примеси 3-гидроксиметил цефазолина, поскольку согласно данным литературы [4] цефазолин гидролизует первоначально до цефазолина лактона, затем эта примесь распадается до цефазолина с открытым лактонным кольцом.

¹⁷ 04/2019:0988 Cefazolin sodium. European Pharmacopoeia 11.6.

¹⁸ 04/2019:0988 Cefazolin sodium. European Pharmacopoeia 11.6.

ФС.2.1.0315 Цефазолин натрия. Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. Т. 2. М.; 2023.

¹⁹ 01/2008:0992 Cefuroxime sodium. European Pharmacopoeia 11.6.

²⁰ Cefazolin sodium. United States Pharmacopoeia. USP NF; 2024.

²¹ Там же.

²² Там же.

²³ Там же.

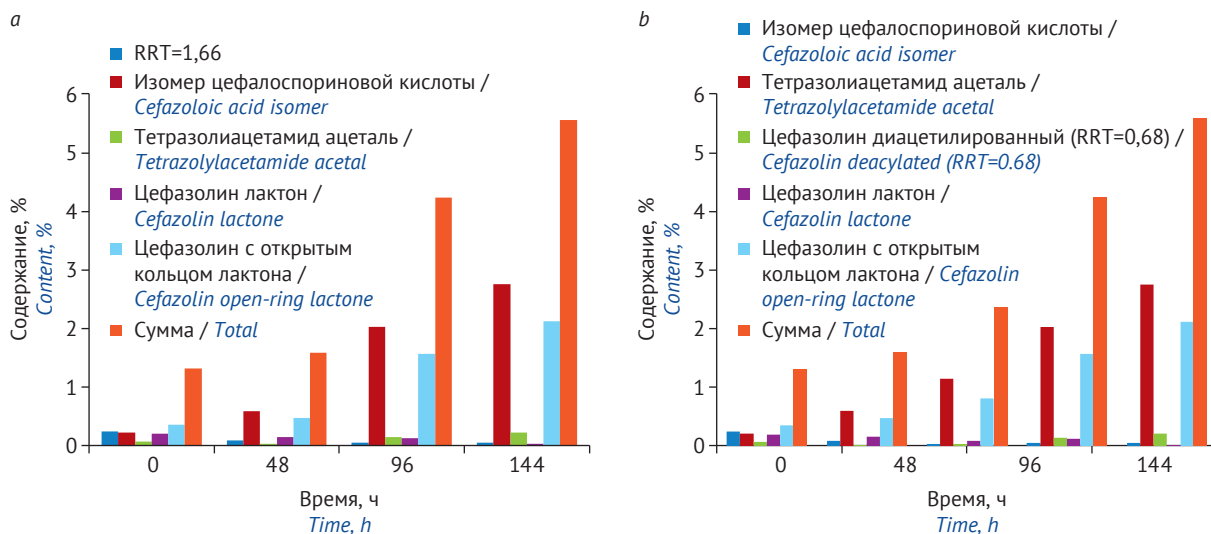


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Изменение содержания примесей в 10% (а) и 0,25% (б) растворах цефазолина в процессе хранения при комнатной температуре на свету без доступа прямых солнечных лучей. RRT – относительное время удерживания соответствующей примеси

Fig. 2. Changes in the content of impurities in 10% (a) and 0.25% (b) cefazolin solutions during storage at room temperature in natural light (away from direct sunlight). RRT, relative retention time of the corresponding impurity

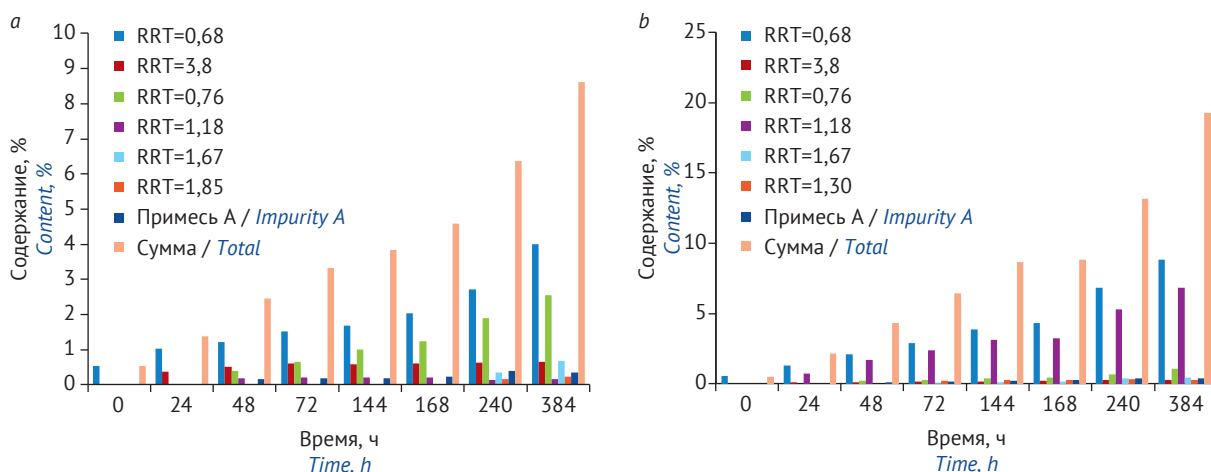
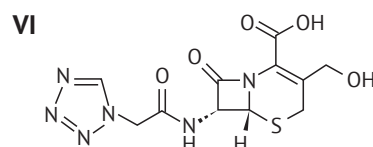
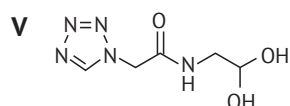


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Изменение содержания примесей в 1,2% (а) и 0,03% (б) растворах цефтриаксона в процессе хранения при комнатной температуре на свету без доступа прямых солнечных лучей. RRT – относительное время удерживания соответствующей неидентифицированной примеси

Fig. 3. Changes in the content of impurities in 1.2% (a) and 0.03% (b) ceftriaxone solutions during storage at room temperature in natural light (away from direct sunlight). RRT, relative retention time of the corresponding unspecified impurity



Диаграммы процесса деструкции цефтриаксона в растворах разных концентраций представлены на рисунке 3. Согласно требованиям Ph. Eur. предельное содержание единичной примеси в цефтриаксоне натрия должно быть не более 1,0%, суммарно – не более 4,0%.

Процесс разложения цефтриаксона в разбавленном 0,03% растворе протекал интенсивнее, чем в более концентрированном. Сумма примесей (4,2%) в первом случае не соответствовала требованиям Ph. Eur. через 48 ч, во втором – через 168 ч (4,5%).

Накопление единичных примесей цефтриаксона имело некоторые различия в растворах разных концентраций. Значительное увеличение с 0,5% в начале испытания (0 ч) до 1,5% через 72 ч и до 4,0% в конце срока хранения наблюдали для соединения с относительным временем удерживания (reference retention time, RRT) 0,68 в 1,2% растворе цефтриаксона. В разбавленном в 40 раз растворе количество этой же примеси возрастало с 0,5% (0 ч) до 2,0% через 48 ч и в конечной точке эксперимента превысило 8,0%. В то же время в разбавленном растворе наблюдали существенное увеличение примеси с RRT 1,18, которая в свежеприготовленных растворах обеих концентраций не проявлялась на хроматограммах. Количество этой примеси практически не изменилось в 1,2% растворе, но постепенно увеличилось содержание примеси с RRT 0,76. Количество остальных примесей не превышало фармакопейных норм, содержание примеси А (Е-изомер цефтриаксона)²⁴ оставалось практически неизменным в течение всего эксперимента.

Результаты оценки стабильности растворов цефуроксима разных концентраций представлены на рисунке 4. Примесь А — основной продукт деградации цефуроксима — нормируется отдельно от суммы других примесей (не более 1,0%)²⁵. В свежеприготовленных растворах цефуроксима содержание примеси А (декарбомилцефуроксим; (6R,7R)-7-[[[(2Z)-2-(фуран-2-ил)-2-метоксииминоацетил]

амино]-3-(гидроксиметил)-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоновая кислота)²⁶ составило менее 0,4%, затем через 24 ч увеличилось до 2,5% в 10%-ном растворе цефуроксима и почти до 5,0% в разбавленном растворе. Таким образом, цефуроксим в данном исследовании проявил себя наименее стабильным соединением в водных растворах, через 24 ч содержание примеси А превысило нормативные требования в 2,5–5 раз.

Стандарт качества на смесь цефтриаксона с сульбактамом (2:1) в ведущих фармакопеях в настоящее время не представлен. В связи с этим была изучена стабильность раствора смеси цефтриаксона с сульбактамом (содержание цефтриаксона 1,2%) по отношению к стабильности сухой смеси, из которой через указанные промежутки времени отбирали навески и проводили определение примесей в свежеприготовленном (не более 2 ч хранения) растворе той же концентрации. Влияние естественного освещения на стабильность порошка смеси изучаемых веществ оказалось незначительным, сумма примесей не превысила 1,2% на 16 сут хранения (рис. 5a). Деструкция цефтриаксона с сульбактамом в водном растворе протекала интенсивно, сумма примесей на конец испытания составила около 9% (рис. 5b).

Поскольку деградация в разбавленных растворах цефазолина (0,25%), цефтриаксона (0,03%) и цефуроксима (0,1%) проходила интенсивнее, чем в растворах более высоких концентраций

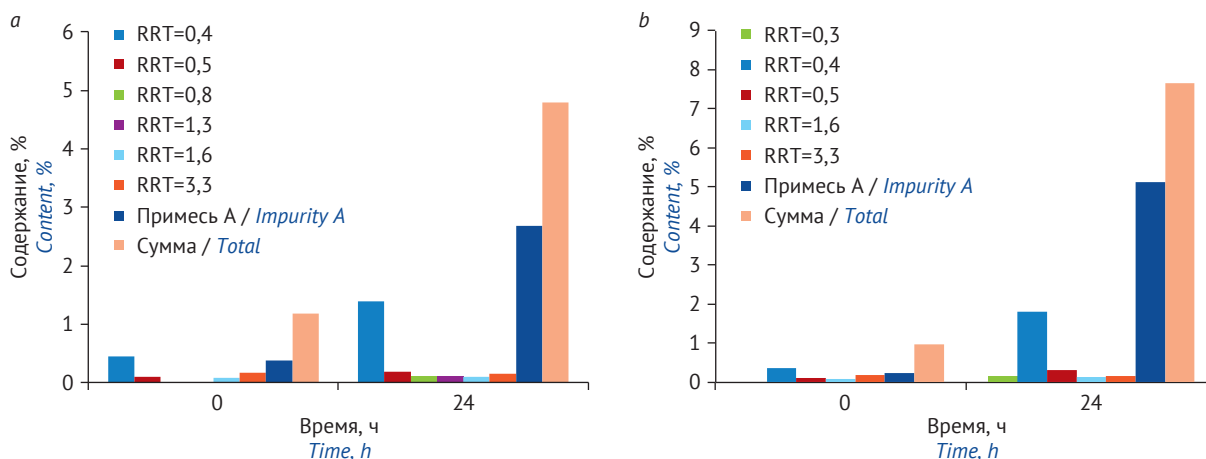


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Изменение содержания примесей в 10% (a) и 0,1% (b) растворах цефуроксима в процессе хранения при комнатной температуре на свету без доступа прямых солнечных лучей. RRT — относительное время удерживания соответствующей неидентифицированной примеси

Fig. 4. Changes in the content of impurities in 10% (a) and 0.1% (b) cefuroxime solutions during storage at room temperature in natural light (away from direct sunlight). RRT, relative retention time of the corresponding unspecified impurity

²⁴ 01/2009:0991 Ceftriaxone sodium. European Pharmacopoeia 11.6.

²⁵ 01/2008:0992 Cefuroxime sodium. European Pharmacopoeia 11.6.

²⁶ Там же.

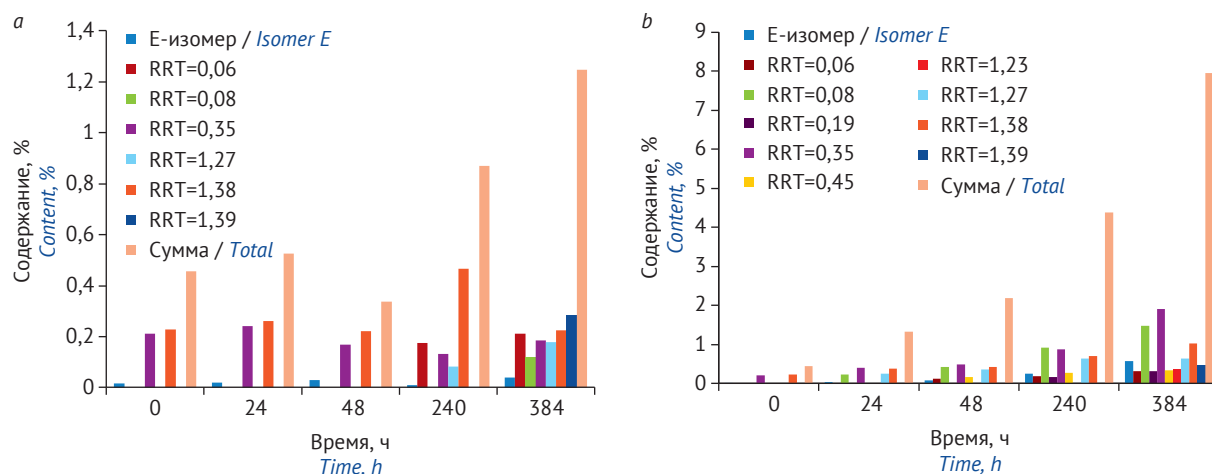


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Изменение содержания примесей в сухой смеси цефтриаксона с сульбактамом (свежеприготовленный раствор) (a) и в растворе смеси (b) в процессе хранения при комнатной температуре на свету без доступа прямых солнечных лучей. RRT – относительное время удерживания соответствующей неидентифицированной примеси

Fig. 5. Changes in the content of impurities in ceftriaxone-sulbactam solution when prepared (a) and during storage at room temperature in natural light (away from direct sunlight) (b). RRT, relative retention time of the corresponding unspecified impurity

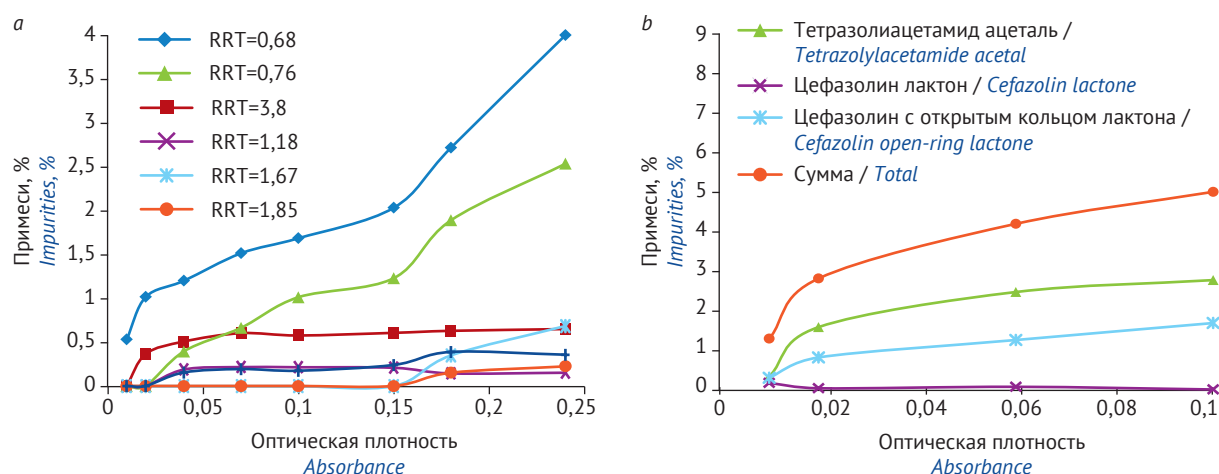


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 6. Изменение значений оптической плотности и содержания примесей в 1,2% растворе цефтриаксона (a) и 10% растворе цефазолина (b) в процессе хранения при комнатной температуре на свету без доступа прямых солнечных лучей. RRT – относительное время удерживания соответствующей неидентифицированной примеси

Fig. 6. Changes in the absorbance and impurity content in 1.2% ceftriaxone solution (a) and 10% cefazolin solution (b) during storage at room temperature in natural light (away from direct sunlight) (b). RRT, relative retention time of the corresponding unspecified impurity

(10% растворы цефазолина и цефуроксима, 1,2% раствор цефтриаксона), и наблюдали минимальное разложение β -лактамных соединений в порошке по сравнению с растворами, можно предположить, что водная среда и ее объем являются основными факторами, влияющими на накопление родственных примесей в процессе хранения. При этом в процессе деградации молекулы исследуемых антибиотиков в водных растворах разрушаются с образованием преимущественно одной-двух примесей в течение 24–96 ч, тогда как содержание остальных родственных соединений изменяется незначительно.

Визуально можно отметить увеличение оптической плотности при увеличении суммы примесей в растворах цефтриаксона и цефазолина, однако линейная функция не подтверждена статистически, что связано, скорее всего, с неравномерным вкладом примесных продуктов в общее поглощение исследуемых растворов.

Учитывая, что растворы исследуемых цефалоспоринов в процессе хранения при естественном освещении приобретали более интенсивную желтую окраску, можно предположить, что в процессе деструкции образуются родственные примеси

исследуемых β -лактамных соединений, интенсивно поглощающие в диапазоне длин волн синей области видимого спектра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стабильность водных растворов цефазолина, цефтриаксона, цефтриаксона с сульбактамом (2:1) и цефуроксима по показателям «Цветность раствора» и «Примеси» зависит от химического строения вещества, концентрации растворов и длительности хранения при естественном освещении. Между значениями оптической плотности растворов цефазолина и цефтриаксона отмечена визуально наблюдаемая взаимосвязь

с увеличением количества отдельных примесей, однако четкой линейной зависимости не выявлено, что, вероятно, обусловлено неравномерным вкладом примесных продуктов в общее поглощение исследуемых растворов. Проведенные исследования могут быть полезны при разработке и оптимизации методик, необходимых для оценки качества и стабильности лекарственных средств β -лактамных соединений. На основании полученных результатов в дальнейших исследованиях предполагается оценить изменение чувствительности тест-микроорганизмов к цефалоспоринам, подвергшимся деструкции под воздействием внешних факторов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Скляренко АВ, Грошкова ИА, Горбунов НА, Яроцкий СВ. Биокаталитический синтез новых цефалоспоринов с использованием иммобилизованной синтетазы цефалоспоринов-кислот. *Биотехнология*. 2022;38(2):43–56. Sklyarenko AV, Groshkova IA, Gorbunov NA, Yarotsky SV. Biocatalytic synthesis of new cephalosporins using immobilized cephalosporin-acid synthetase. *Biotechnology*. 2022;38(2):43–56 (In Russ.). <https://doi.org/10.56304/S0234275822020089>
2. Скляренко АВ, Грошкова ИА, Горбунов НА, Яроцкий СВ. Альтернативный синтез цефазолина с использованием синтетазы цефалоспоринов-кислот. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020;56(5):452–64. <https://doi.org/10.31857/S055510992005013X> Sklyarenko AV, Groshkova IA, Gorbunov NA, Yarotsky SV. Alternative cefazolin synthesis with a cephalosporin-acid synthetase. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020;56(5):526–37. <https://doi.org/10.1134/S0003683820050130>
3. Xu QA, Trissel LA, Saenz CA, Ingram DS, Williams KY. Stability of three cephalosporin antibiotics in AutoDos Infusion System bags. *J Am Pharm Assoc (Wash)*. 2002;42(3):428–31. <https://doi.org/10.1331/108658002763316851>
4. Yamana T, Tsuji A. Comparative stability of cephalosporins in aqueous solution: Kinetics and mechanisms of degradation. *J Pharm Sci*. 1976;65(11):1563–73. <https://doi.org/10.1002/jps.2600651104>
5. Серченя ТС, Горбачева ИВ, Свиридов ОВ. Прямое конъюгирование пенициллинов и цефалоспоринов с белками для рецепторного анализа бета-лактамных антибиотиков. *Биоорганическая химия*. 2022;48(1):63–74. <https://doi.org/10.31857/S0132342322010122> Serchenya TS, Harbachova IV, Sviridov OV. Direct conjugation of penicillins and cephalosporins with proteins for receptor assays of beta-lactam antibiotics. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2022;48(1):85–95. <https://doi.org/10.1134/S1068162022010125>
6. Катаева НН, Шулепова КЕ. Сравнительный анализ физико-химических свойств водных растворов цефалоспоринов I и III поколений. В кн.: Привалова ЕГ, ред. *Инновационные технологии в фармации*. Иркутск; 2023. С. 36–40. Kataeva NN, Shulepova KE. Comparative analysis of aqueous solute ions the physico-chemical properties in I and III generation cephalosporins. In: Privalova EG, ed. *Innovative technologies in pharmacy*. Irkutsk; 2023. P. 36–40 (In Russ.). EDN: IKQANP

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: С.И. Кулешова — идея, общая концепция исследования, написание текста рукописи, анализ результатов; И.А. Денисова — подбор методик, проведение испытания методом ВЭЖХ, анализ результатов; Т.И. Пшеничных — выполнение испытаний спектрофотометрическим и визуальными методами, измерение pH, анализ результатов.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Svetlana I. Kuleshova conceived the study idea, conceptualised the study, drafted the manuscript, and analysed the results. Irina A. Denisova selected analytical procedures, conducted HPLC testing, and analysed the results. Tatiana I. Pshenichnykh conducted the tests using spectrophotometric and visual methods, measured the pH, and analysed the results.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Кулешова Светлана Ивановна, канд. биол. наук / Svetlana I. Kuleshova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9103-9239>

Денисова Ирина Анатольевна / Irina A. Denisova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-5155-2979>

Пшеничных Татьяна Ивановна / Tatiana I. Pshenichnykh

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8445-8902>

Поступила 27.11.2024

После доработки 16.01.2025

Принята к публикации 11.02.2025

Received 27 November 2024

Revised 16 January 2025

Accepted 11 February 2025



Н.А. Алпатова 
О.В. Головинская  
М.Л. Байкова 
С.Л. Лыскова 
Л.А. Гайдерава 

Экспертная оценка определения специфической активности препаратов моноклональных антител биологическим методом *in vitro*

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

✉ Головинская Ольга Вячеславовна; golovinskaya@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В целях контроля качества биотехнологических лекарственных препаратов используется ряд биологических методик. Разработка методик определения специфической активности препарата представляет собой сложную процедуру, которая должна отвечать рекомендациям регуляторных нормативных документов, а для адекватного воспроизведения таких методик необходимо их корректное представление в проекте нормативной документации на лекарственный препарат.

ЦЕЛЬ. Обобщение рекомендаций по разработке и описанию в проекте нормативной документации биологических методик *in vitro* для определения активности лекарственных средств на основе моноклональных антител.

ОБСУЖДЕНИЕ. Описаны Fab- и Fc-ассоциированные механизмы проявления биологической активности препаратов моноклональных антител (моно- и биспецифических), рассмотрены *in vivo* и *in vitro* методы изучения указанных механизмов, акцент сделан на анализе репортерного гена. Сформулировано понятие о целостной аналитической системе, необходимой при разработке биологических методик, и проанализированы ее составляющие. Показано, что методика с надежным дизайном позволяет минимизировать влияние критических факторов на результат и снизить риск возникновения случайных и систематических ошибок. Оценена значимость детального отражения критических параметров методики в проекте нормативной документации на лекарственные препараты моноклональных антител.

ВЫВОДЫ. Биологические методики определения активности должны отражать механизм действия лекарственного препарата, а также обладать наименее возможной вариабельностью и наиболее возможной простотой воспроизведения. Адекватность методики и правильно подобранные условия ее применения обеспечивают снижение риска получения недостоверных результатов при контроле качества лекарственного препарата.

Ключевые слова: моноклональные антитела; лекарственные препараты; оценка качества лекарственных препаратов; биологические методики *in vitro*; нормативная документация; биологическая активность; специфическая активность; культуры клеток

Для цитирования: Алпатова Н.А., Головинская О.В., Байкова М.Л., Лыскова С.Л., Гайдерава Л.А. Экспертная оценка определения специфической активности препаратов моноклональных антител биологическим методом *in vitro*. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2025;15(1):44–56. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-44-56>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Natalia A. Alpatova 
Olga V. Golovinskaya 
Marina L. Baykova 
Svetlana L. Lysikova 
Lidia A. Gaiderova 

Expert Assessment of *In Vitro* Potency Assays for Monoclonal Antibody Preparations

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

✉ Olga V. Golovinskaya; golovinskaya@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The quality control of biotechnological medicinal products requires a range of biological assay procedures. The development of bioassays for potency determination is a complex process that should comply with the requirements set forth in regulatory standards. For adequate reproducibility, bioassays should be properly described in draft product specification files.

AIM. This study aimed to summarise the recommendations for developing *in vitro* bioassays for potency determination of monoclonal antibody preparations and for describing these bioassays in product specification files.

DISCUSSION. This article describes the Fab- and Fc-associated biological activity mechanisms of monospecific and bispecific monoclonal antibodies. The article covers *in vivo* and *in vitro* methods used to study these mechanisms, with emphasis on the reporter gene assay. The article formulates the concept and analyses the components of a holistic analytical system that is necessary for bioassay development. A well-designed analytical procedure can minimise the influence of critical factors on the test results and reduce the risks of both random and systematic errors. This article presents an estimation of the significance of detailed description of critical procedure parameters in the draft product specification file for a monoclonal antibody.

CONCLUSIONS. A bioassay for the determination of potency should reflect the mechanism of action of the medicinal product and should provide the lowest possible variability and the highest possible ease of use. An adequate analytical procedure with appropriate analytical conditions can reduce the risk of obtaining invalid quality control results.

Keywords: monoclonal antibodies; medicinal products; quality assessment of medicinal products; *in vitro* bioassay; regulatory standards; biological activity; potency; cell cultures

For citation: Alpatova N.A., Golovinskaya O.V., Baykova M.L., Lysikova S.L., Gaiderova L.A. Expert assessment of *in vitro* potency assays for monoclonal antibody preparations. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(1):44–56. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-44-56>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Моноклональные антитела (МкАТ) — группа лекарственных препаратов, широко представленная как на международном, так и на отечественном фармацевтических рынках [1]. Строгая специфичность к целевым антигенам и избирательное взаимодействие с целевыми рецепторами обеспечивают высокий уровень эффективности МкАТ, что вместе с присущим им разнообразием структуры способствует успешному применению в терапии различных заболеваний.

Лекарственные препараты (ЛП) МкАТ в зависимости от структуры и направленности действия

подразделяются на простые терапевтические, модифицированные МкАТ (биспецифические антитела, Fv-, Fab-, F(ab)₂-фрагменты антител) и конъюгированные, содержащие МкАТ и иное лекарственное средство (ЛС) [2]. Критичные параметры качества (СQA) биотехнологических ЛП — «физические, химические, биологические, микробиологические свойства или характеристики, которые должны находиться в пределах соответствующего диапазона для обеспечения надлежащего качества продукта»¹, устанавливаются и детально изучаются на этапе разработки препарата, оцениваются в процессе

¹ ICH Q8 (R2) Pharmaceutical development. Scientific guideline.

коммерческого производства с целью выявления его изменчивости, а также контролируются при управлении жизненным циклом после регистрации для гарантии стабильности качества получаемого продукта. Так, критичными для препаратов МкАТ являются молекулярная характеристика (структура, размер, агрегация, гетерогенность и гликозилирование) и функциональная оценка (связывание лиганда, аффинность, активность в тестах с использованием культур клеток, эффекторные функции) [3]. Критичность параметров определяется на основе изучения потенциального влияния на безопасность и эффективность ЛП, при этом влияние на клиническую эффективность оценивается с учетом фармакокинетики и биологической активности [4, 5].

Проявление биологической активности МкАТ обусловлено различными механизмами, среди которых выделяют иммуноопосредованную и прямую клеточную токсичность, влияние на костимулирующие сигналы в процессе развития иммунного ответа, подавление синтеза цитокинов, блокаду рецепторов факторов роста и др. [6]. В отличие от других аналитических методов биологические методы определения активности должны отражать механизм действия каждого конкретного ЛП, следовательно, адекватная оценка функциональных характеристик МкАТ способствует правильному определению их биологической активности [7]. На молекулярном уровне в достижении эффектов препаратов МкАТ ключевую роль играют Fab- и Fc-участки их молекул. Fab-фрагмент отвечает за связывание целевого антигена, а взаимодействие Fc-фрагмента с Fc-рецептором клеток иммунной системы в ответ на образование комплекса Fab-фрагмент-антиген инициирует каскад реакций, завершающихся гибелью клетки-мишени.

По принципу действия препарата методики оценки биологической активности можно разделить на две группы. К первой относятся Fab-ассоциированные методики, принцип которых заключается в оценке связывания МкАТ с клетками, пролиферации клеток, апоптоза, нейтрализации действия и др. Ко второй — Fc-ассоциированные методики, принцип которых обусловлен индукцией эффекторных функций: антитело-зависимая клеточная цитотоксичность, антитело-зависимый клеточный фагоцитоз, анализ связывания с Fc-рецепторами, комплемент-зависимая цитотоксичность и др. [8, 9].

Биологические эффекты МкАТ, детерминированные связыванием, изучают и контролируют такими методами, как поверхностный плазмонный резонанс (surface plasmon resonance, SPR), иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), резонансный перенос энергии флуоресценции, биослойная интерферометрия и анализы связывания лиганда с использованием соответствующих клеточных линий [2, 10, 11]. Для МкАТ, клиническая эффективность которых зависит исключительно от степени связывания (например, проявление их нейтрализующего действия), при достаточном обосновании для оценки активности допускается использовать методики определения связывания с мишенью².

Механизм действия МкАТ может быть обусловлен процессами, происходящими после связывания лиганда. Например, в случае МкАТ, характеризующихся наличием различных мишеней, возможно развитие раннего ответа, опосредованного их влиянием на путь передачи сигнала, или позднего ответа за счет влияния на уровень пролиферации клеток или выработку цитокинов. Поэтому целесообразно определить маркер последующего ответа, который обычно подавляется при использовании МкАТ, и оценивать активность конкретного препарата на основе понимания его механизма действия [3]. Если в проявлении клинической эффективности препарата задействованы эффекторные функции МкАТ, необходимо использовать адекватный биологический метод на основе клеток или иную методику, позволяющую оценить данные функции³.

Таким образом, определения только активности связывания недостаточно для полноценной оценки эффективности ряда препаратов МкАТ, и это может привести к определенной степени риска при оценке их качества.

Перспективным биологическим тестом является анализ репортерного гена для определения экспрессии генов, позволяющий провести функциональную оценку, опосредованную связыванием [12]. Использование репортерных клеточных систем основано на способности функциональных белковых молекул при взаимодействии с рецептором на мембране клетки активировать пути передачи сигналов внутри клеток с участием транскрипционных факторов, в результате чего наблюдается экспрессия репортерного

² Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

³ Там же.

гена, как правило, флуоресцентного белка, которая далее количественно оценивается [13]. Анализ репортерного гена, отражающий механизм действия препарата, являясь более точным, менее вариабельным и трудозатратным, применяется при изучении характеристик, стабильности и доказательстве биоподобия МкАТ, а также для оценки их качества по показателю «Специфическая активность» [14–16].

При изучении биологических свойств и специфической биологической активности терапевтических МкАТ применяют биологические методы *in vivo* и *in vitro* [17]. На этапах разработки использование для оценки активности ЛС методов *in vivo* обосновано, но из-за присущих биологическим методам с использованием животных высокой вариабельности и недостаточной чувствительности при внутрипроизводственном и выпускающем контроле качества, а также в процессе управления жизненным циклом ЛП целесообразно использовать клеточные анализы *in vitro* [3, 18], которые, в свою очередь, позволяют отражать ключевые аспекты механизма действия терапевтического МкАТ [19] и выявлять влияние посттрансляционных модификаций, таких как дезамидирование в области, определяющей комплементарность взаимодействия, или в Fc-области молекулы МкАТ, на проявление активности ЛП [20]. Необходимо учитывать, что определение активности важно при подтверждении стабильности производства МкАТ, и методы ее оценки должны быть достаточно чувствительными для своевременного обнаружения изменений качества препарата МкАТ, которые могут сказаться на его эффективности⁴. При проведении клинических исследований ЛП важно оценить взаимосвязь между проявлением клинического эффекта и специфической биологической активностью, которая оценивается с помощью биологической методики количественного определения.

В Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) и Фармакопее Евразийского экономического союза (ФЕАЭС) к настоящему времени не регламентировано определение специфической активности ЛП на основе МкАТ биологическим методом *in vitro*. Специфическая активность оценивается с использованием оригинальных методик производителей ЛП. При этом должно быть показано, что методика может быть использована для обнаружения

проявления биологической активности и обладает достаточной чувствительностью и специфичностью [21]. В проект нормативной документации ЛП следует включать валидованную биологическую методику, воспроизводимую в условиях аналитической лаборатории.

Цель работы — обобщение рекомендаций по разработке биологических методик *in vitro* для определения активности лекарственных средств на основе моноклональных антител и рекомендаций по описанию указанных методик в нормативной документации.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Рекомендации по разработке биологических методик *in vitro* для определения активности лекарственных средств на основе МкАТ

Общие положения и определения. Биологические методы играют ключевую роль в контроле качества биофармацевтических препаратов, подтверждая постоянство их критических показателей от серии к серии. Разработка методик для оценки активности МкАТ является важным компонентом мониторинга их качества. Целью разработки биологического метода количественного определения является обеспечение оптимальной правильности и прецизионности оценки специфической активности ЛП.

При выборе методик в первую очередь следует определить область их будущего применения: для испытаний при выпуске активной фармацевтической субстанции и ЛП; для оценки стабильности; для аттестации стандартного образца (СО); для изучения характеристик промежуточных продуктов; при оценке сопоставимости продуктов для обоснования изменений, вносимых в процесс производства, и др. Для каждой задачи могут быть установлены разные требования к правильности, специфичности, прецизионности и робастности методики. При этом оптимальным вариантом является разработка и валидация биологической методики оценки активности для многоцелевого применения⁵.

В процессе разработки биологической методики количественного определения активности на основе клеточного анализа большое значение имеет создание целостной аналитической системы, которая позволит достоверно оценивать специфическую активность ЛС. Важную роль играют статистические составляющие,

⁴ [Guidelines for the production and quality control of monoclonal antibodies and related products intended for medicinal use. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, No. 822, 2022.](#)

⁵ [\(1032\) Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.](#)

такие как тип данных, интенсивность ответа при разных концентрациях, статистическая модель обработки данных, критерии пригодности, анализ выбросов и др. Большинство биологических методик количественного определения предполагает изучение зависимости ответа от концентрации стандартного и испытуемого образцов⁶.

При разработке биологической методики *in vitro* необходимо учитывать следующие определения:

- *независимое испытание* — испытание, в котором все этапы проведения (от забора образца из флакона до получения результата) воспроизводятся для одного планшета, т.е. одному планшету для анализа соответствует один планшет с разведениями, при этом исходные разведения стандартного, контрольного и испытуемого образцов с заданной концентрацией, а также клеточная суспензия с рабочей концентрацией готовятся независимо;
- *независимое разведение* (одна серия) — процесс разведения, который начинается от забора раствора из флакона с исходным образцом и заканчивается получением серии растворов с концентрациями заданного диапазона. Минимальное рекомендованное количество независимых разведений одного образца равно двум;
- *серия разведений* — последовательное снижение концентрации растворов образцов с определенным коэффициентом разведения (шагом) для получения растворов в заданном диапазоне концентраций. Как правило, в методиках оценки активности в серии разведений анализируют от 6 до 10 концентраций. Серии разведений образцов можно получить разными способами, среди которых выделяют: последовательные разведения — каждая из концентраций готовится из предыдущей, а также непоследовательные разведения — приготовление растворов каждой концентрации в серии проводится отдельно из одного исходного флакона с образцом. Следует отметить, что существует промежуточный вариант: одну часть растворов готовят из растворов одной и той же предшествующей концентрации, другую

часть — из растворов другой предшествующей концентрации;

- *повторности* — повторное внесение в лунки планшета образцов одной и той же независимой серии разведений, что способствует снижению появления случайных ошибок (наиболее часто применяется внесение 2–3 повторностей на планшет);
- *отчетное значение* — результат испытания, который представляет собой среднее значение результатов всех независимых испытаний и соответствует установленной для испытуемого образца норме. В подавляющем большинстве случаев количество независимых испытаний равно трем.

Поддержание валидности аналитической системы обеспечивается комплексом составляющих, таких как поверенное оборудование; сертифицированные/квалифицированные реактивы; сертифицированные материалы; аттестованные стандартные и пригодные контрольные образцы; контролируемые условия проведения испытаний; четкое описание аналитических процедур; адекватно подобранная статистическая модель; подходящее программное обеспечение⁷.

Стандартные образцы (СО). Из-за вариабельности, присущей биологическим объектам, специфическая активность в абсолютной системе отсчета — величина менее постоянная, чем относительная активность, которая оценивается путем сравнения зависимости «доза–ответ» препарата и соответствующего СО, активность которого принимается за 1 (или за 100%)⁸. Предполагают, что стандартный и испытуемый образцы биологически подобны, и можно ожидать, что испытуемый образец будет проявлять активность аналогично стандартному образцу.

Биологические методики, применяемые для оценки качества ЛС, должны быть стандартизованы с применением соответствующих международных или фармакопейных стандартных образцов (МСО или ФСО). В течение многих лет после регистрации первых оригинальных ЛП МкАТ такие стандарты отсутствовали, поскольку действующие вещества МкАТ, являясь биотехнологическими продуктами, не имеют природного аналога [22]. В настоящее время утверждено несколько МСО ВОЗ⁹ и стандартов

⁶ 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.

⁷ (1034) *Analysis of biological assays*. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.

⁸ (1032) *Design and development of biological assays*. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.

⁹ *Medicines & Healthcare products Regulatory Agency*.

¹⁰ *Ph. Eur. Reference standards: Orders and catalogue*.

Европейской фармакопеи¹⁰, предназначенных для использования в биологических методиках определения активности ряда препаратов МкАТ.

При отсутствии международных или фармакопейных стандартов для определения активности должен быть разработан СО предприятия, кандидатом которого является серия активной фармацевтической субстанции, охарактеризованная с применением более широкого спектра методов, чем при тестировании в рамках выпуска партий. На поздних этапах разработки СО должен быть изготовлен с применением технологического процесса, который использовался при производстве серий препарата для клинических исследований¹¹.

Для определения количественных характеристик СО необходимо правильное и прецизионное измерение его биологической активности с проведением дополнительных повторных испытаний, поскольку присвоение аттестуемой характеристики стандарту — один из наиболее важных факторов, влияющих на правильность и прецизионность биологического анализа количественного определения специфической активности.

Клеточные линии. Разработка биологической методики количественного определения *in vitro* начинается с выбора или создания клеточной линии. Применяют клеточные линии, полученные из опухолей (например, U-937, линия клеток гистиоцитарной лимфомы человека), фактор-зависимые клеточные линии (например, M-NFS-60, линия клеток миелоидного лейкоза мыши, чувствительная к макрофагальному колониестимулирующему фактору и интерлейкину-3), генетически сконструированные клеточные линии (например, клетки Jurkat-Lucia™ NFAT Cells, полученные из клеточной линии Т-лимфоцитов человека Jurkat посредством стабильной интеграции NFAT-индуцируемого репортерного гена, кодирующего люциферазу Lucia), к которым предъявляются определенные требования. Важным этапом является проверка допустимости использования подходящей линии клеток не только в исследовательских целях, но и при оценке качества ЛП. Следует фиксировать сведения о функциональных и генетических характеристиках линии клеток для биологического метода от ее источника до создания банка клеток. Актуальными являются сведения о морфологии, подлинности, чистоте, условиях криоконсервации, размораживания и культивирования клеток, характеристиках их роста,

функциональной стабильности. Достижения технологии рекомбинантной ДНК и понимание сигнальных механизмов клетки позволили сконструировать линии клеток, позволяющие более точно определять биологическую активность и характеризующиеся постоянным уровнем экспрессии рецепторов, изученной системой передачи сигналов, а также более длительной стабильностью.

Широкий спектр использования клеточных линий при производстве, изучении механизмов действия, эффективности и безопасности биотехнологических ЛП, а также при оценке их качества диктует необходимость проведения аутентификации клеточных линий, а также разработки методов контроля их качества и стандартизации. Следует оценивать специфические параметры, такие как подлинность клеточной линии (генетическое соответствие источнику получения, наличие определенных поверхностных маркеров) и безопасность (отсутствие контаминации вирусами, бактериями, грибами, генетическим материалом других клеточных линий). Аутентификация клеточной линии — это доказательство соответствия исходному материалу на уровне ДНК и отсутствия контаминации другими клеточными линиями [23–25].

Методики с использованием клеточных культур отличаются особой чувствительностью к изменению условий проведения испытания, а также вариабельностью получаемых результатов, поэтому целесообразно учитывать ряд факторов, влияющих на определение активности: тип клеточной культуры (адгезионная или суспензионная), условия размораживания и культивирования, концентрация и конfluэнтность клеток, состав сред для роста и анализа, условия инкубации, подсчет клеток и оценка их физиологического состояния, номер пассажа клеток, стабильность клеточной линии (уровни экспрессии рецепторов, маркеров)¹².

Выбор условий проведения испытания. Процессы разработки и валидации аналитических методик взаимосвязаны. В каждой методике можно выделить критичные параметры, замена которых приводит к изменению рабочих характеристик методики. Для биологических методик *in vitro* к данным параметрам относятся: клеточная линия, стандартный и контрольный образцы, питательные среды и используемая сыворотка, красители / наборы для детектирования, стабильность образцов/растворов/реагентов, тип

¹¹ (1032) Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.

¹² Там же.

и характеристики используемых планшетов, специфическое оборудование, продолжительность инкубации (клеточных культур, образцов и т.д.). Информацию о критичных параметрах следует включать в описание методики. По результатам изучения данных параметров делают вывод об устойчивости (робастности методики) на стадии ее разработки¹³.

При воспроизведении методики существует вероятность появления ошибок, как случайных, так и систематических. Поэтому при разработке условий проведения испытания возможность возникновения ошибок должна быть сведена к минимуму. Поскольку разброс данных является мерой прецизионности, то чем меньше величина случайных ошибок, тем выше прецизионность методики. В появлении случайных ошибок (ошибок при проведении манипуляций) не наблюдается какой-либо закономерности, они происходят при любой постановке и обусловлены субъективными факторами. Способ выявления случайных ошибок — постановка анализа в двух и более повторностях, что приводит к увеличению выборки.

Систематические ошибки имеют определенную причину, повторяются при каждом измерении и влияют на всю серию определений. В качестве причин могут выступать ошибки приборов, неточности в дизайне методики, анализе или описании результатов, а в качестве последствий — возможно искажение результатов испытания. Величина систематической ошибки характеризует правильность результатов, а вероятность обнаружения и предупреждения систематических ошибок не изменяется при увеличении выборки и представляет собой более сложную задачу. Вероятность появления систематических ошибок снижает рандомизация.

Дизайн планшета и рандомизация. Основное условие достоверности многих статистических тестов — рандомизация, то есть случайное распределение серий разведений образцов на планшете, при котором влияние известных и неизвестных факторов (источников систематических ошибок) распределяется равномерно, так, чтобы все объекты во всех лунках планшета в одинаковой степени получили определенное воздействие¹⁴.

Схема распределения серий разведений образцов на планшете должна быть разработана так,

чтобы свести влияние планшета к минимуму [26]. Этого можно достичь, чередуя местонахождение образцов и их разведений на одном или нескольких планшетах. При использовании нескольких планшетов рекомендуется применять дизайн, которым предусмотрено чередование позиций образцов на разных планшетах в рамках одного испытания и для выявления возможной систематической ошибки, вносимой оператором или оборудованием.

Для снижения систематической ошибки между столбцами планшета используют дизайн *strip-plot*, при котором образцы рандомизируются в ряды на планшете, а серии разведений образцов идут в разных направлениях в разных частях планшета. Чередование положений испытуемого и стандартного образцов на нескольких планшетах в рамках одного испытания защищает образцы от влияния их местоположения в ряду планшета. Данный способ рандомизации подходит для внесения образцов на планшет вручную [27].

Альтернативный вариант схемы планшета — *strip-plot*, согласно которому образцы случайным образом распределяются по рядам планшета, а в каждом ряду рандомизируются разведения (концентрации). Однако такую схему внесения образцов сложно применять даже при использовании роботизированной станции¹⁵.

Таким образом, принимая решение о выборе дизайна необходимо не только стремиться снизить риск возникновения систематических ошибок, но и оценить риски возникновения ошибок при проведении манипуляций.

Статистическая модель. Важной составляющей аналитической системы является статистическая модель. Анализировать зависимость «доза–ответ» можно с применением ряда математических моделей, которые позволяют оценить зависимость ответа от концентрации и вычислить относительную специфическую активность.

Модели, отражающие параллельный профиль ответа и позволяющие проводить сравнительную оценку при определении относительной активности, могут быть линейными (модель параллельных прямых) или нелинейными (модель параллельных кривых). Для аппроксимации

¹³ (1033) *Biological assay validation*. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.

ICH Q14 *Analytical procedure development*. Scientific guideline.

¹⁴ (1032) *Design and development of biological assays*. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.

¹⁵ Там же.

модели параллельного ответа к количественным данным можно использовать несколько функций: линейную, 4-параметрическую (для симметричных S-кривых) и 5-параметрическую (для асимметричных S-кривых)¹⁶. Ключевым предположением при оценке активности является биологическое подобие испытуемого и стандартного образцов. Биологическое подобие предполагает наличие подобия статистического:

- для моделей параллельных прямых и параллельных кривых линии зависимости «доза–ответ» стандартного и испытуемого образцов должны быть параллельны;
- для модели линейного ответа — кривая зависимости «доза–ответ» на протяжении ограниченного диапазона концентраций имеет форму прямой или форму, приближенную к прямой.

Для модели параллельных прямых — в интервале нескольких доз ответ связан линейно с величиной логарифма дозы, и оценку активности проводят путем сравнения линий зависимости ответа от используемых доз испытуемого и стандартного образцов, мера подобия — наклон прямых.

Для нелинейной модели «доза–ответ» диапазон используемых концентраций достаточно широк, ответ ограничен верхними и нижними асимптотами, зависимость ответа от дозы представлена S-образной кривой. В биологических методиках оценки активности для анализа данных наиболее часто используется 4-параметрическая логистическая модель, в которой кривые зависимости «доза–ответ» стандартного и испытуемого образцов характеризуются четырьмя параметрами: верхняя и нижняя асимптоты; угловой коэффициент (β); расстояние между кривыми по оси x (γ). Подобие стандартного и испытуемого образцов может быть оценено по наклону кривых зависимости «доза–ответ» и асимптотам [26]. Кривые зависимости образцов можно сравнивать при одинаковом наклоне и одинаковом уровне верхних и нижних асимптот, кривые должны различаться только по параметру γ , который является показателем активности испытуемого образца¹⁷. Учитывая, что результаты биологической методики обычно нелинейны, определяют и используют в расчетах линейную область кривой зависимости «доза–ответ» в большом диапазоне концентраций.

Критерии пригодности системы. Оценка пригодности аналитической системы — это проверка выполнения основных требований, предъявляемых к ней. От результатов такой проверки зависит достоверность результатов испытания.

К критериям пригодности системы относятся критерии, касающиеся результатов, полученных для стандартного и контрольного образцов. Критерии пригодности 4-параметрической системы:

- требования к стандартной кривой зависимости «доза–ответ»:
 - симметричная форма кривой;
 - на верхней и нижней асимптотах, а также линейной части кривой должно находиться не менее 3 точек;
 - коэффициент детерминации R^2 (т.е. степень линейной взаимосвязи между двумя наборами данных) должен составлять, например, $\geq 0,980$;
 - отношение максимального сигнала стандартного образца к минимальному сигналу должно быть, например, ≥ 7 ;
- требование к первичным данным:
 - значения коэффициентов вариации (CV, %) первичных данных (значения оптической плотности, единиц флуоресценции и т.п.) для каждого разведения СО должны находиться в определенном диапазоне (например, не более 15–25%).

Если полученные результаты не отвечают одному или более критериям пригодности, то необходимо проведение повторного испытания. Только при выполнении всех критериев пригодности системы можно оценивать результаты анализа испытуемого образца.

Критерии приемлемости результатов испытания. Приемлемость результатов испытания оценивают для подтверждения, что данные, полученные для испытуемого образца, удовлетворяют предположению о его сходстве со стандартным образцом. Для 4-параметрической модели, например, применимы следующие критерии приемлемости результатов испытания.

- Требования к кривой зависимости «доза–ответ» испытуемого образца:
 - кривые испытуемого и стандартного образцов должны быть признаны эквивалентными (параллельными) по результатам теста на эквивалентность;

¹⁶ (1032) Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.

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.

¹⁷ (1034) Analysis of biological assays. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.

- коэффициент детерминации R^2 должен составлять не менее 0,95;
 - отношение углового коэффициента β должно быть, например, в диапазоне от 0,80 до 1,25;
 - соотношение значений верхних асимптот кривых испытуемого и стандартного образцов¹⁸ должно быть, например, в диапазоне от 0,80 до 1,25;
 - соотношение значений нижних асимптот кривых испытуемого и стандартного образцов¹⁹ должно быть, например, в диапазоне от 0,80 до 1,25.
- Требование к первичным данным:
 - значения CV для каждого разведения испытуемого образца должны находиться в определенном диапазоне (например, не более 15–25%).

Если хотя бы один из критериев не выполняется, расчет отчетного значения не производят. Если для результатов, полученных для испытуемого образца, выполняются критерии приемлемости и сходства со стандартным образцом, рассчитывают относительную активность, которая определяется как отношение значений полумаксимальных разведений или концентраций для стандартного и испытуемого образцов.

Одного независимого испытания бывает недостаточно для получения отчетного значения, включаемого в протокол испытания, поэтому для определения активности объединяют результаты нескольких независимых испытаний и рассчитывают среднее. Затем рассчитывают дисперсию и меру неопределенности оценки относительной активности.

- Требование к результатам испытаний:
 - коэффициент вариации значений активности испытуемого образца, полученных в результате валидированного количества независимых испытаний, должен составлять, например, не более 15–25%.

Если результат не удовлетворяет требованиям, испытание повторяют.

Особенности оценки активности биспецифических МкАТ. Биспецифические антитела (BsAbs) (относятся к иммуноглобулинам класса G (IgG)) фактически аналогичны по структуре моноспецифическим. Отличие состоит в том, что Fab-фрагменты биспецифического антитела различны, что позволяет ему связывать либо две

разные мишени, либо два разных эпитопа одной и той же мишени [12, 28, 29]. Также разработаны IgG-подобные (dual variable domain Ig, DVD-Ig) и отличающиеся от IgG (bispecific T-cell engager, BiTE) биспецифические антитела, взаимодействующие с Т-клетками [30].

К общим механизмам действия BsAbs относится прямое связывание с растворимыми мишенями (лигандами, цитокинами) или рецепторами на поверхности клеток с подавляющим или стимулирующим эффектом [31]. Из-за специфичности одного ЛП к разным мишеням биологические методики для оценки активности BsAbs должны предусматривать возможность отразить несколько механизмов действия препарата, а также выявить его потенциальные синергические эффекты и структурные изменения [31, 32].

Для препаратов BsAbs допустим поэтапный подход к внедрению биологического метода определения активности. На ранних этапах разработки возможно применение методик оценки связывания (ELISA или SPR). На более поздних этапах, перед клиническими исследованиями, целесообразна разработка биологических методик *in vitro*. При этом дизайн биологических тестов определяется предполагаемым физиологическим механизмом действия BsAbs, в зависимости от которого применяют одну или две методики оценки активности. Для определения активности при выпуске препарата и тестировании стабильности целесообразно разработать комбинированную методику анализа, позволяющую реализовать оба механизма действия биспецифического антитела в одном тесте, однако такой подход применим не к каждому препарату BsAbs [32].

Таким образом, биологические методики отражают аспекты активности МкАТ, включая связывание лиганда с рецептором, процессы передачи сигнала и конечные наблюдаемые биологические эффекты. Результаты оценки биологической активности имеют решающее значение на всех этапах разработки биотехнологических продуктов, от ранних этапов до контроля качества готовой продукции.

Рекомендации по изложению методики в проекте нормативной документации

В соответствии с положениями «Руководства по составлению нормативного документа (НД) по качеству лекарственного препарата»²⁰

¹⁸ Может быть оценено не соотношение асимптот, а отклонение асимптот, выраженное в %.

¹⁹ То же.

²⁰ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 07.09.2018 № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».

«Нормативный документ по качеству на основании проведенной экспертизы лекарственного препарата устанавливает требования к контролю качества лекарственного препарата и содержит спецификацию и описание методик испытаний или ссылки на соответствующие фармакопейные статьи ФЕАЭС. Если метод и (или) методика испытания не описаны в ФЕАЭС, приводится полное описание применяемых метода и (или) методики». Проект нормативной документации должен содержать подробное описание методики определения активности с включением необходимой информации для ее воспроизведения и объективного анализа полученных данных.

В ГФ РФ и ФЕАЭС не регламентирована процедура определения специфической активности МкАТ, поэтому с целью унификации изложения раздела «Специфическая активность» в проектах НД на ЛП данной группы авторы, руководствуясь нормативно-правовыми актами в сфере обращения лекарственных средств на территории РФ²¹, общими фармакопейными статьями ГФ РФ²², положениями зарубежных фармакопей²³ и руководством²⁴, а также многолетним экспертным опытом [33], обобщили рекомендации к содержанию указанного раздела (табл. 1)²⁵. Название показателя и в спецификации, и в тексте проекта должно быть идентично принятому в ОФС.1.7.1.0014.18 «Моноклональные антитела для медицинского применения» ГФ РФ XIV изд. В случае когда

Таблица 1. Содержание раздела «Специфическая активность» проекта нормативной документации на моноклональные антитела для медицинского применения

Table 1. Content of the Potency section of a draft product specification file for a monoclonal antibody for human use²⁵

Подраздел	Содержание подраздела
Норма	Верхняя и нижняя границы нормы с указанием единиц измерения (как указано в Спецификации)
Метод	Название метода (как указано в Спецификации), в скобках может быть указан способ оценки активности (например, биологический метод <i>in vitro</i> (определение комплемент-зависимой цитотоксичности))
Принцип метода	Лаконично изложенный механизм действия лекарственного препарата, отражающий суть методики
Оборудование	Полный пронумерованный перечень оборудования: названия производителей и моделей, указание на возможность использования аналогичного
Материалы	Полный пронумерованный перечень материалов: названия производителей, действительные каталожные номера, указание на возможность использования аналогичных, если допустимо, или на недопустимость замены, если материалы критичные
Реактивы	Полный пронумерованный перечень реактивов: названия производителей, действительные каталожные номера, указание на возможность использования аналогичных, если допустимо, или на недопустимость замены, если реактивы критичные
Стандартные/контрольные (если применимо) образцы	Полное название, активность или концентрация (с указанием единиц измерения аттестованной характеристики), производитель (для международных и фармакопейных стандартных образцов — код и каталожный номер соответственно), условия и срок хранения образца до и после использования; для внутреннего стандартного образца фирмы — откалиброван ли он относительно международного или фармакопейного; для контрольного образца — является ли он самостоятельным образцом или в качестве внутреннего контрольного образца используют независимое разведение стандарта
Клеточные линии	Полные названия клеточных линий, коллекций культур клеток, каталожные номера (или указание на рабочий банк клеток фирмы-производителя) и условия хранения; данные о клеточных линиях, не требующих рутинного культивирования, готовых к приготовлению рабочей суспензии сразу после оттаивания (ready-to-use или ready-to-plate)
Программное обеспечение	Полный перечень программ (с номером версии) для статистической обработки результатов анализа

²¹ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 07.09.2018 № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».

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

²² 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.

²³ (1032) Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.

(1034) Analysis of biological assays. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024

2928 Infliximab concentrated solution. European Pharmacopoeia.

²⁴ ICH Topic Q6B Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products.

ICH Q14 Analytical procedure development. Scientific guideline.

²⁵ Перевод таблицы 1 размещен на сайте журнала (English translation of Table 1 is available at the website of the journal). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-44-56-table1>

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Подраздел	Содержание подраздела
Приготовление культуральных сред и рабочих растворов реактивов	Подробное последовательное описание процедур приготовления питательных сред, растворов реактивов и реагентов, указание масс навесок, объемов растворителей, конечных концентраций или процентного содержания всех компонентов, входящих в состав раствора, условия приготовления (нагревание, перемешивание, фильтрование, асептические условия и т.п.), условия применения (нагревание, охлаждение, защита от света и т.п.), условия хранения (температура, допустимость и длительность хранения до и после использования в испытании и т.п.). В названии отражают назначение раствора/среды
Работа с культурой клеток	Подробное описание этапов работы с клеточной культурой: 1. Инициация клеточной культуры — условия и продолжительность оттаивания, манипуляции с культурой после восстановления: нейтрализация среды для замораживания, центрифугирование, подсчет, посев в культуральные флаконы, условия последующей инкубации, допустимый предел жизнеспособности клеток при размораживании. 2. Рутинное культивирование (для клеток «ready-to-use» пункт пропускается) — процедура пере-сева, концентрация клеточной суспензии в зависимости от периодичности пассажей и площади флакона, допустимый предел жизнеспособности клеток, допустимый предел конfluэнтности, процедура подсчета клеток, формулы определения плотности и жизнеспособности клеток с под-формульными расшифровками, условия инкубации, количество пассажей с момента инициации до использования культуры в испытании, номер пассажа, после которого культуру не используют. 3. Подготовка клеточной суспензии для использования в испытании — процедура доведения клеточной суспензии до рабочей концентрации, объем, достаточный для одного планшета
Приготовление разведений стандартного/контрольного/испытуемого образцов	Подробное и последовательное описание пробоподготовки: предварительные манипуляции с образцами (размораживание, восстановление, выдерживание при комнатной температуре), продолжительность и условия хранения после размораживания/восстановления, приготовление исходных разведений образцов с указанием растворителя и концентрации образца, пошаговая инструкция приготовления серийных разведений в формате таблицы (кратность разведений, ис-ходная и конечная концентрации на каждом этапе, объемы образца и растворителя для каждой концентрации), схема планшета для приготовления разведений с расшифровкой (если примени-мо), указание на количество повторностей одной серии разведений каждого образца, которые предполагается вносить на аналитический планшет
Процедура проведения испытания	Подробное и последовательное описание этапов заполнения аналитического планшета в том порядке, который предусмотрен методикой: объем и концентрация клеточной суспензии, объемы и концентрации образцов, вносимых в лунки планшета, объемы и концентрации других реаген-тов, используемых в испытании, продолжительность и условия инкубации планшета на каждом этапе заполнения, схема аналитического планшета с расшифровкой; пояснение, что представ-ляет собой одно независимое испытание (например, результат, полученный на одном планшете для анализа, для которого независимо были приготовлены: клеточная суспензия, серия разведе-ний каждого образца, другие реагенты), а также количество независимых испытаний, достаточ-ных для получения отчетного значения (например, 3)
Учет результатов	Порядок и условия регистрации результатов (встряхивание планшетов перед считыванием, длины волн, количество вспышек на лунку, точка считывания (дно/поверхность), направление считывания (по рядам/по столбцам) и другие параметры настроек прибора, которые не являются установленными по умолчанию
Анализ данных	Статистическая модель для анализа результатов считывания, параметры статистической аналити-ческой программы, которые необходимо задать для получения отчетного значения, формулы расчетов с подформульными расшифровками и единицами измерения, рисунок типичной кривой зависимости «доза–ответ», указание, что каждый планшет анализируется независимо
Критерии пригодности системы	Перечень критериев соответствия результатов, полученных для стандартного образца (сим-метричность кривой зависимости «доза–ответ», амплитуда отклика, значения коэффициентов корреляции и вариации первичных данных для повторностей каждой концентрации и т.д.)
Критерии приемлемости результатов испытания	Перечень критериев, доказывающих подобие испытуемого (контрольного) и стандартного образ-цов (соотношение значений угловых коэффициентов, верхних асимптот, нижних асимптот кривых испытуемого (контрольного) и стандартного образцов; значения коэффициентов вариации перв-ичных данных для повторностей каждой концентрации испытуемого (контрольного) образца)
Отчетное значение активности	Формула для вычисления значения относительной специфической активности одного независи-мого определения, формула расчета отчетного значения специфической активности испытуемо-го образца на основании значений активности, полученных в результате установленного коли-чества независимых испытаний, которые удовлетворяют всем критериям пригодности системы и приемлемости результатов), подформульные обозначения, допустимое значение коэффициента вариации значений независимых определений активности
Несоответствие результатов	Порядок действий при получении неудовлетворительных результатов (при оценке критериев пригодности системы или приемлемости результатов, при расчете отчетного значения, включаемого в протокол испытания)

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

«Подлинность»/«Идентификация» препаратов МкАТ оцениваются по их способности проявлять специфическую активность, формулировка названия метода должна в точности соответствовать формулировке, приведенной для показателя «Специфическая активность» с указанием на одновременное определение этих показателей, а нормативные требования устанавливаются как «должен проявлять специфическую активность в заданном диапазоне».

Следует отметить, что приведенный в *таблице 1* пример содержания раздела «Специфическая активность» нормативной документации также применим к большинству биотехнологических препаратов, специфическая активность которых определяется биологическим методом на культуре клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биологические методики *in vitro*, применяемые для количественного определения активности

препаратов МкАТ разной специфичности, отличаются принципом действия и имеют свои особенности. Для воспроизведения конкретной методики необходима соответствующая чувствительная культура клеток, определенный набор питательных сред, реагентов и материалов, для учета результатов – подходящее высокочувствительное оборудование. В связи с этим изложение методик оценки качества препарата должно соответствовать требованиям²⁶ к оформлению нормативного документа, быть подробным, последовательным и понятным. Корректное оформление нормативной документации обеспечивает точное воспроизведение методик испытаний, выполнение лабораторной фармацевтической экспертизы образцов лекарственных средств в контрольных аналитических лабораториях на должном уровне, получение адекватных результатов экспертизы и правильную их трактовку и снижает риск поступления в медицинскую практику недоброкачественных лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Халимова АА, Орлов АС, Таубэ АА. Анализ локализации производства биотехнологических лекарственных препаратов в России с учетом происхождения активных фармацевтических субстанций. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(1):53–61. Khalimova AA, Orlov AS, Taube AA. Analysis of biopharmaceutical manufacturing localisation in Russia considering the country of origin of active pharmaceutical ingredients. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(1):53–61 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-1-53-61>
2. Gogesch P, Dudek S, van Zandbergen G, Waibler Z, Anzaghe M. The role of Fc receptors on the effectiveness of therapeutic monoclonal antibodies. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8947. <https://doi.org/10.3390/ijms22168947>
3. Wang X, An Z, Luo W, Xia N, Zhao Q. Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development. *Protein Cell*. 2018;9(1):74–85. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0447-x>
4. Alt N, Zhang TY, Motchnik P, Taticek R, Quarmany V, Schlothauer T, et al. Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles. *Biologicals*. 2016;44(5):291–305. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2016.06.005>
5. Gao X, Wang W, Tesar D, Wei B, Eschelbach J, Kelley RF, Jiang G. An approach to bioactivity assessment for critical quality attribute identification based on antibody-antigen complex structure. *J Pharm Sci*. 2021;110(4):1652–60. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.12.027>
6. Joshi S, Rathore AS, Krull IS. Analytical characterization of biotherapeutic products, Part II: The analytical toolbox. *LCGC North Am*. 2018;36(11):814–22.
7. Rathore AS, Dash R. Tools for functional assessment of biotherapeutics. *LCGC North Am*. 2021;39(6):272–77.
8. Cedeño-Arias M, Sánchez-Ramírez J, Blanco-Santana R, Rengifo-Calzado E. Validation of a flow cytometry based binding assay for evaluation of monoclonal antibody recognizing EGF receptor. *Sci Pharm*. 2011;79(3):569–81. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1104-18>
9. Kamen L, Myneni S, Langsdorf C, Kho E, Ordonia B, Thakurta T, et al. A novel method for determining antibody-dependent cellular phagocytosis. *J Immunol Methods*. 2019;468:55–60. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.03.001>
10. Dash R, Singh SK, Chirmule N, Rathore AS. Assessment of functional characterization and comparability of biotherapeutics: a review. *AAPS J*. 2021;24(1):15. <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00671-0>
11. Heinrich L, Tissot N, Hartmann DJ, Cohen R. Comparison of the results obtained by ELISA and surface plasmon resonance for the determination of antibody affinity. *J Immunol Methods*. 2010;352(1–2):13–22. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.10.002>
12. Register AC, Tarighat SS, Lee HY. Bioassay development for bispecific antibodies-challenges and opportunities. *Int J Mol Sci*. 2021;22(10):5350. <https://doi.org/10.3390/ijms22105350>
13. Wang L, Yu C, Wang J. Development of reporter gene assays to determine the bioactivity of biopharmaceuticals. *Biotechnol Adv*. 2020;39:107466. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107466>
14. Chen W, Pandey M, Sun H, Rolong A, Cao M, Liu D, et al. Development of a mechanism of action-reflective, dual target cell-based reporter bioassay for a bispecific monoclonal antibody targeting human CTLA-4 and PD-1. *MAbs*. 2021;13(1):1914359. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1914359>
15. Lallemand C, Liang F, Staub F, Simansour M, Vallette B, Huang L, et al. A novel system for the quantification of the ADCC activity of therapeutic antibodies. *J Immunol Res*. 2017;2017:1–19. <https://doi.org/10.1155/2017/3908289>
16. Wang L, Yu C, Yang Y, Gao K, Wang J. Development of a robust reporter gene assay to measure the bioactivity of anti-PD-1/anti-PD-L1 therapeutic antibodies. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;145:447–53. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.011>
17. Alhazmi HA, Albratty M. Analytical techniques for the characterization and quantification of monoclonal antibodies. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(2):291. <https://doi.org/10.3390/ph16020291>
18. Bansal R, Dash R, Rathore AS. Impact of mAb aggregation on its biological activity: Rituximab as a case study. *J Pharm Sci*. 2020;109(9):2684–98. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.05.015>
19. Tada M, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Kawasaki N. Development of a cell-based assay measuring the activation of FcγRIIIa for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. *PLoS One*. 2014;9(4):e95787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095787>
20. Geigert J. Quality attributes of a biopharmaceutical. In:

²⁶ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 07.09.2018 № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».

- Geigert J. *The challenge of CMC regulatory compliance for biopharmaceuticals*. Switzerland: Springer; 2019. P. 311–29.
21. Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК, Мотузова ЕВ, Лысикова СЛ, Солдатов АА, Авдеева ЖИ. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(1):13–26. Alpatova NA, Gaiderova LA, Yakovlev AK, Motuzova EV, Lysikova SL, Soldatov AA, Avdeeva Zhl. Peculiarities of determination of specific activity of biotechnological medicinal products. *BiOpreparations. Prevention, diagnostics, treatment*. 2017;17(1):13–26 (In Russ.). EDN: YHSSGL
 22. Prior S, Hufton SE, Fox B, Dougall T, Rigsby P, Bristow A. International standards for monoclonal antibodies to support pre- and post-marketing product consistency: Evaluation of a candidate international standard for the bioactivities of rituximab. *MAbs*. 2018;10(1):129–42. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1386824>
 23. Rižner TL, Adamski J. It is high time to discontinue use of misidentified and contaminated cells: Guidelines for description and authentication of cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;182:1–3. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.12.017>
 24. Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Меркулов ВА, Олефир ЮВ, Ручко СВ, Бокованов ВЕ. Идентификация клеточных линий человека с использованием метода генотипирования короткими tandemными повторами: мировая практика. *Биофармацевтический журнал*. 2015;7(6):3–10. Melnikova EV, Merkulova OV, Merkulov VA, Olefir YuV, Ruchko SV, Bokovanov VE. Human cell line identification by typing of short tandem repeats: World practice. *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2015;7(6):3–10 (In Russ.). EDN: VRRBXF
 25. Хорольский МД, Семенова ИС, Мельникова ЕВ, Олефир ЮВ. Применение метода коротких tandemных повторов для аутентификации клеточных линий. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):251–60. Khorolsky MD, Semenova IS, Melnikova EV, Olefir YuV. The use of short tandem repeat analysis for cell line authentication. *BiOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):251–60 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-251-260>
 26. White JR, Abodeely M, Ahmed S, Debaue G, Johnson E, Meyer DM, 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>
 27. Zimmermann H, Gerhard D, Dingermaier T, Hothorn LA. Statistical aspects of design and validation of microtitre-plate-based linear and non-linear parallel *in vitro* bioassays. *Biotechnol J*. 2010;5(1):62–74. <https://doi.org/10.1002/biot.200900146>
 28. Surowka M, Klein C. A pivotal decade for bispecific antibodies? *MAbs*. 2024;16(1):2321635. <https://doi.org/10.1080/19420862.2024.2321635>
 29. Nie S, Wang Z, Moscoso-Castro M, D'Souza P, Lei C, Xu J, Gu J. Biology drives the discovery of bispecific antibodies as innovative therapeutics. *Antib Ther*. 2020;3(1):18–62. <https://doi.org/10.1093/abt/tbaa003>
 30. Mohan N, Ayinde S, Peng H, Dutta S, Shen Y, Falkowski VM. Structural and functional characterization of IgG- and non-IgG-based T-cell-engaging bispecific antibodies. *Front Immunol*. 2024;15:1376096. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1376096>
 31. Lee HY, Contreras E, Register AC, Wu Q, Abadie K, Garcia K, et al. Development of a bioassay to detect T-cell-activating impurities for T-cell-dependent bispecific antibodies. *Sci Rep*. 2019;9(1):3900. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40689-1>
 32. Lee HY, Schaefer G, Lesaca I, Lee CV, Wong PY, Jiang G. “Two-in-One” approach for bioassay selection for dual specificity antibodies. *J Immunol Methods*. 2017;448:74–9. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.05.011>
 33. Головинская ОВ, Лысикова СЛ, Лебедева ЮН, Алпатова НА, Мовсесянц АА, Меркулов ВА. Рекомендации по изложению методики оценки биологической (специфической) активности биотехнологических лекарственных препаратов в нормативной документации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(3):168–74. Golovinskaya OV, Lysikova SL, Lebedeva YuN, Alpatova NA, Movsesyants AA, Merkulov VA. Recommendations for the presentation of the methodology for assessing the biological (specific) activity of biotechnological drugs in regulatory documentation. *BiOpreparations. Prevention, diagnostics, treatment*. 2018;18(3):168–74 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-168-174>

Дополнительная информация. Перевод таблицы 1 размещен на сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств».

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-44-56-table1>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Н.А. Алпатова — идея исследования, написание текста рукописи, обобщение материалов исследования; О.В. Головинская — концепция и дизайн исследования, формулировка выводов; М.Л. Байкова — обобщение материалов исследования, интерпретация результатов; С.Л. Лысикова — сбор данных литературы; Л.А. Гайдерова — утверждение окончательной версии рукописи для опубликования.

Additional information. Table 1 in English is published on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-44-56-table1>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Natalia A. Alpatova conceived the study idea, drafted the manuscript, and summarised the study material. Olga V. Golovinskaya conceptualised and designed the study; formulated the conclusions. Marina L. Baykova summarised the study material and interpreted the results. Svetlana L. Lysikova collected literature data. Lidia A. Gaiderova approved the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Алпатова Наталья Александровна, д-р биол. наук / Natalia A. Alpatova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6807-508X>

Головинская Ольга Вячеславовна, канд. мед. наук / Olga V. Golovinskaya, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6966-9859>

Байкова Марина Леонидовна / Marina L. Baykova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9889-4038>

Лысикова Светлана Леонидовна, канд. мед. наук / Svetlana L. Lysikova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7864-8972>

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук / Lidia A. Gaiderova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

Поступила 25.11.2024

После доработки 15.01.2025

Принята к публикации 11.02.2025

Received 25 November 2024

Revised 15 January 2025

Accepted 11 February 2025



С.Л. Аджиахметова ,
А.Е. Позднякова 

Разработка методики количественного определения холина в каплях ушных на основе омелы белой листьев экстракта густого

Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, пр. Калинина, д. 11, г. Пятигорск, 357532, Российская Федерация

✉ Аджиахметова Симила Леонтьевна; similla503@mail.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Причиной разработки нового состава капель, обладающих церуменолитическим действием, на основе экстракта густого омелы белой листьев (*Viscum album* L.) явился неудовлетворенный спрос на препараты такого действия. Одним из обязательных этапов подготовки регистрационного досье на лекарственное средство является разработка методики количественного анализа основного действующего вещества (холина), содержащегося в омелы белой листьев экстракте густом.

ЦЕЛЬ. Разработка методики количественного определения с последующей валидацией холина в каплях ушных церуменолитического действия на основе *Viscum album* листьев экстракта густого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Наличие азотистых оснований устанавливали методом бумажной хроматографии. В качестве неподвижной фазы использовали бумагу хроматографическую марки Munktell (класс FN7, размер 4×25 см). В качестве подвижной фазы применяли системы растворителей: *n*-бутанол — этанол — уксусная кислота — вода (8:2:1:3), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5), уксусная кислота — вода (15:85); в качестве проявителя — пары йода. Спектрофотометрическое определение азотистых оснований проводили с использованием спектрофотометра СФ-102, длина волны 400±2 нм, в присутствии соли рейнеката аммония (соли Рейнеке). Валидацию методики количественного определения сложных эфиров холина проводили по показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Разработана и валидирована методика количественного определения содержания сложных эфиров холина в пересчете на холин в ушных каплях церуменолитического действия на основе омелы белой листьев экстракта густого, основанная на спектрофотометрическом определении в присутствии соли Рейнеке. В анализируемых ушных каплях с использованием разработанной методики идентифицированы холин и его сложные эфиры: ацетилхолин, йодид ацетилхолина и бензоилхолин. Содержание сложных эфиров холина в пересчете на холин составило 0,710±0,018%.

ВЫВОДЫ. Разработанная методика количественного определения сложных эфиров холина, основанная на спектрофотометрическом определении в присутствии соли Рейнеке, может быть предложена для контроля качества капель ушных церуменолитического действия на основе омелы белой листьев экстракта густого.

Ключевые слова: холин; сложные эфиры холина; капли ушные; омелы белой листьев экстракт густой; омела белая; бумажная хроматография; спектрофотометрия; валидация; церуменолитик; серные пробки

Для цитирования: Аджирахметова С.Л., Позднякова А.Е. Разработка методики количественного определения холина в каплях ушных на основе омелы белой листьев экстракта густого. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(1):57–62. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-668>

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Similla L. Adzhiakhmetova ,
Anastasiya E. Pozdnyakova 

Development of an Analytical Procedure for the Quantitative Determination of Choline in Ear Drops Based on *Viscum album* Leaf Soft Extract

*Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Branch of the Volgograd State Medical University,
11 Kalinin Ave, Pyatigorsk 357532, Russian Federation*

✉ **Similla L. Adzhiakhmetova;** similla503@mail.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. A new ear drop composition based on European mistletoe (*Viscum album* L.) leaf soft extract was developed to meet the demand for cerumenolytic ear drops. The registration dossier for this medicinal product must include an analytical procedure for the quantitative analysis of the main active substance in *V. album* leaf soft extract (choline).

AIM. This study aimed to develop and validate an analytical procedure for the quantitative determination of choline in cerumenolytic ear drops based on *V. album* leaf soft extract.

MATERIALS AND METHODS. The presence of nitrogenous bases was determined by paper chromatography. Munktell chromatography paper (grade FN7, size 4×25 cm) was used as the stationary phase. The mobile phase consisted of the following solvent systems: *n*-butanol – ethanol – acetic acid – water (8:2:1:3), *n*-butanol – acetic acid – water (4:1:5), and acetic acid – water (15:85). The colour development reagent was iodine vapour. The spectrophotometric determination of nitrogenous bases was conducted using an SF-102 spectrophotometer and a detector at a wavelength of 400±2 nm in the presence of ammonium reineckate (Reinecke's salt). The analytical procedure for the quantitative determination of choline ethers was validated for specificity, linearity, accuracy, and precision.

RESULTS. This study developed and validated a spectrophotometric analytical procedure for the quantitative determination of choline ethers calculated as choline in cerumenolytic ear drops based on *V. album* leaf soft extract in the presence of Reinecke's salt. The analytical procedure identified choline and its esters (acetylcholine, acetylcholine iodide, and benzoylcholine) in the analysed ear drops. The content of choline esters calculated as choline was 0.710±0.018%.

CONCLUSIONS. The spectrophotometric analytical procedure for the quantitative determination of choline ethers in the presence of Reinecke's salt can be recommended for the quality control of cerumenolytic ear drops based on *V. album* leaf soft extract.

Keywords: choline; choline esters; ear drops; *Viscum album* L. leaf soft extract; *Viscum album* L.; European mistletoe; paper chromatography; spectrophotometry; validation; cerumen impaction; cerumenolytic agent

For citation: Adzhiakhmetova S.L., Pozdnyakova A.E. Development of an analytical procedure for the quantitative determination of choline in ear drops based on *Viscum album* leaf soft extract. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(1):57–62. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-668>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Ушная сера обеспечивает механическую и микробиологическую защиту эпителиального слоя наружного слухового прохода. При накоплении ушной серы вследствие нарушения естественного механизма самоочищения уха может образоваться серная пробка. Скопление ушной серы препятствует оценке состояния уха, а при патологическом процессе вызывает неприятные симптомы: шум в ушах, чувство распирания, боль, что в случае запущенного состояния приводит к потере слуха [1]. Чаще сталкиваются с такой проблемой около 10% детей и одна треть лиц пожилого возраста с когнитивными нарушениями [2].

Важными параметрами при определении стратегии лечения серных пробок являются: фармакоэкономические факторы, стоимость препаратов, количество необходимых медицинских вмешательств, приверженность к лечению, сопутствующие нежелательные явления (например, нейросенсорная тугоухость), скорость улучшения качества жизни [3]. Методы удаления серной пробки, как правило, включают ирригацию и ручное удаление с помощью специализированных инструментов, могут быть также использованы церуменолитики (вещества, размягчающие ушную серу) [4, 5].

Неудовлетворенный спрос на лекарственные препараты церуменолитического действия явился причиной разработки нового состава на основе омелы белой листьев (*Viscum album* L.) экстракта густого [6, 7]. Основным действующим веществом листьев *V. album* является холин, обладающий церуменолитическим действием [8], а его содержание зависит от фазы вегетации и составляет 2,9–5,1%. Представляется необходимым разработать валидированную методику количественного анализа по холину в каплях ушных на основе омелы белой листьев экстракта густого.

Цель работы — разработка методики количественного определения холина в каплях ушных церуменолитического действия на основе омелы белой листьев экстракта густого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись капли ушные церуменолитического действия на основе омелы белой листьев экстракта густого. Разработка состава и технологии производства ушных капель представлена в работе [6]. Состав ушных капель церуменолитического действия: омелы белой листьев экстракт густой 0,0250 г; гиалуронат

натрия 0,2000 г; бензалкония хлорид 0,0075 г; вода очищенная до 25 мл. Состав модельной смеси: гиалуронат натрия 0,2000 г; бензалкония хлорид 0,0075 г; вода очищенная до 25 мл.

Качественное определение азотистых оснований.

Наличие азотистых оснований устанавливали методом бумажной хроматографии, поскольку известны факторы удерживания холина и его сложных эфиров, что позволяет сравнивать полученные результаты с данными литературы, не прибегая к использованию в ходе анализа стандартных образцов [9, 10]. Это упрощает воспроизведение процедуры и дает экономические преимущества перед другими методиками (возможность воспроизведения методики анализа в лабораториях с недостаточным оснащением).

В качестве неподвижной фазы использовалась бумага хроматографическая Munktell (класс FN7, размер 4×25 см). В качестве подвижной фазы применяли систему растворителей Аугустинсо и Грана: *n*-бутанол — этанол — уксусная кислота — вода (8:2:1:3)¹. Также использовали системы элюентов: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5), уксусная кислота — вода (15:85). В качестве проявителя выступали пары йода.

Для нанесения пробы использовали дозатор механический одноканальный варьируемого объема, 0,5–10 мкл (BIONIT). Объем наносимой пробы исследуемых ушных капель — 10 мкл.

Количественное определение сложных эфиров холина.

Одним из точных и высокоселективных методов среди известных инструментальных методов количественного определения является высокоэффективная жидкостная хроматография. Применение этого метода, однако, имеет ряд экономических ограничений, например необходимость использования нескольких стандартных образцов. В этой связи целесообразнее использовать более доступный с позиции себестоимости анализа метод, каким является спектрофотометрия. В основе методики количественного содержания азотистых оснований лежит определение оптической плотности окрашенных комплексов холина и его производных с реинекатом аммония (солью Рейнеке) [11, 12].

В мерную колбу вместимостью 50 мл взвешивали и помещали 25,0 мл исследуемых ушных капель, доводили объем раствора до метки водой очищенной (раствор А). 30,0 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и прибавляли по каплям 2 М раствор кислоты хлористоводородной (35,0%, х.ч.,

¹ Хайс ИМ, Мацек К, ред. Хроматография на бумаге. М.: Издательство иностранной литературы; 1962.

ООО «Химпром-М») до pH 3 (по универсальному индикатору). Полученный раствор охлаждали до 0 °С, прибавляли 45 мл раствора соли Рейнеке (95,0%, ч., ООО «ХимКрафт»), оставляли в холодильнике на 18 ч при температуре 8 °С и доводили объем раствора до метки водой очищенной. Осадок отфильтровывали через стеклянный фильтр № 4 и промывали на ледяной бане *n*-бутанолом (99,7%, х.ч., ООО «Химпром-М») 3 раза порциями по 5 мл. Затем осадок на фильтре растворяли при этой же температуре в ацетоне (99%, х.ч., ООО «Химпром-М») и объем полученного фильтрата доводили в мерной колбе ацетоном до 10 мл.

Оптическую плотность полученного раствора измеряли не позднее чем через 5 мин на спектрофотометре СФ-102 с максимумом поглощения при длине волны 400±2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали ацетон. Параллельно в тех же условиях измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца (СО) холин-хлорида с солью Рейнеке.

Приготовление раствора стандартного образца холин-хлорида. Около 0,2 г (точная навеска) стандартного образца (СО) холин-хлорида помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 9 мл воды очищенной, прибавляли по каплям 2 М раствор кислоты хлористоводородной до pH 3 по универсальному индикатору. Полученный раствор охлаждали до 0 °С, прибавляли 15 мл раствора соли Рейнеке, оставляли в холодильнике на 18 ч и доводили объем раствора до метки водой очищенной. Осадок отделяли и при этой же температуре растворяли в минимальном объеме ацетона, затем доводили тем же растворителем до объема 10 мл. 3,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем. Оптическую плотность раствора измеряли не позднее чем через 5 мин. Использовали СО холин-хлорида (98%, Sigma-Aldrich, кат. номер а6625).

Содержание холина в пересчете на холин-хлорид ($X_{\%}$, %) вычисляли по формуле (1).

$$X_{\%} = \frac{A_x \times 50 \times 100 \times a_0 \times 10 \times 3 \times P}{a_x \times 30 \times 10 \times A_0 \times 25 \times 10}, \quad (1)$$

где A_x — оптическая плотность исследуемого раствора при длине волны 400±2 нм; A_0 — оптическая плотность СО холин-хлорида при длине

волны 400±2 нм; a_x — навеска лекарственного препарата, г; a_0 — навеска СО холин-хлорида, г; P — содержание холин-хлорида в СО, 98%.

Приготовление раствора соли Рейнеке. Около 1,5 г кристаллической соли Рейнеке растворяли в 80 мл воды очищенной, доводили полученный раствор до pH 1 по универсальному индикатору 2 М раствором кислоты хлористоводородной, фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора до метки водой очищенной.

Валидацию методики количественного определения холина проводили по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик (Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Качественное определение азотистых оснований. На хроматограммах образца ушных капель при использовании системы растворителей: *n*-бутанол — этанол — уксусная кислота — вода (8:2:1:3) фиксируются четыре зоны адсорбции, имеющие темно-оранжевую окраску, которые можно отнести к зонам адсорбции азотистых оснований. При сравнении экспериментальных факторов удерживания с данными литературы идентифицированы холин, ацетилхолин, йодид ацетилхолина и бензоилхолин² (табл. 1), также имеется одна размытая зона адсорбции. Наилучшее разделение наблюдалось при использовании системы растворителей *n*-бутанол — этанол — уксусная кислота — вода (8:2:1:3), поэтому для подтверждения наличия азотистых оснований в анализируемых ушных каплях использовали эту систему растворителей.

Валидация методики количественного определения сложных эфиров холина

Специфичность. Установлено, что максимум поглощения растворов образцов капель ушных, содержащих омелы белой листьев экстракта густого, в присутствии соли Рейнеке находится при 400±2 нм и совпадает с максимумом поглощения комплекса СО холин-хлорида с солью Рейнеке (I), а раствор модельной смеси лекарственной формы, не содержащей холин, имеет неизбирательное поглощение в анализируемом диапазоне (рис. 1). Таким образом, данная методика определения количественного содержания азотистых оснований специфична.

² Хайс ИМ, Маецк К, ред. Хроматография на бумаге. М.: Издательство иностранной литературы; 1962.

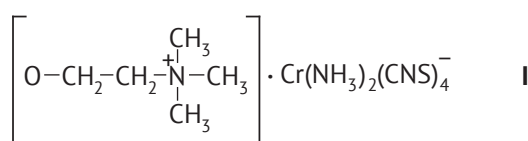
Таблица 1. Результаты анализа методом тонкослойной хроматографии образца капель ушных на основе омелы белой листьев экстракта густого**Table 1.** Results of thin-layer chromatography of a sample of ear drops based on the *Viscum album* L. leaf soft extract

Значение факторов удерживания <i>Retention factor values</i>		Обнаруженные холин и его сложные эфиры <i>Choline and choline esters detected</i>
ушных капель <i>ear drops</i>	стандартных образцов* <i>reference samples*</i>	
0,37±0,01	0,37	холин / <i>choline</i> ацетилхолин / <i>acetylcholine</i> йодид ацетилхолина / <i>acetylcholine iodide</i> бензоилхолин / <i>benzoylcholine</i>
0,49±0,02	0,47	
0,60±0,00	0,58	
0,70±0,02	0,70	

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

* Данные получены из: Хайс ИМ, Мацек К, ред. Хроматография на бумаге. М.: Издательство иностранной литературы; 1962.

* The data are obtained from Hayes I., Matzek K., Paper chromatography. Moscow, IL, 1962, 852 p.



Линейность методики устанавливали, используя пять растворов анализируемых ушных капель различной концентрации (в диапазоне 0,100–0,200 мг/мл). Мерой линейности служил коэффициент корреляции $\geq 0,99$. Количественное соотношение объема пробы анализируемой лекарственной формы и раствора соли Рейнеке, приготовленных по методике, представленной выше, составляет 1:1,5. Уравнение зависимости оптической плотности от концентрации холина в анализируемых растворах представляет собой прямую ($y=1,56x+0,0136$) с высоким коэффициентом корреляции ($R^2=0,9961$), что подтверждает линейность методики в диапазоне концентраций от 0,100 до 0,200 мг/мл.

Точность (правильность). В качестве исходного раствора использовали исследуемый раствор лекарственной формы с концентрацией, соответствующей верхнему пределу линейности методики (0,200 мг/мл). Из этого раствора готовили разведения в соотношении 1:2; 1:1; 1:0,5. На каждом уровне концентраций рассчитывали открываемость. На каждом уровне концентраций (1:2; 1:1; 1:0,5) получены сопоставимые результаты при относительном стандартном отклонении (RSD) 2,267% и стандартном отклонении (SD) 2,265%.

Прецизионность. Готовили шесть испытуемых растворов исследуемых ушных капель 25 мл (0,150 мг/мл). Результаты характеризуются удовлетворительной сходимостью с относительным стандартным отклонением результатов 3,03%.

С использованием разработанной методики было определено содержание холина в каплях

ушных на основе омелы белой листьев экстракта густого, $0,710 \pm 0,018\%$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения содержания сложных эфиров холина в пересчете на холин в ушных каплях церуменолитического действия на основе омелы белой листьев экстракта густого, основанная на спектрофотометрическом определении в присутствии соли Рейнеке при длине волны 400 ± 2 нм.

С использованием разработанной методики определено содержание идентифицированных холина и его сложных эфиров в каплях ушных на основе омелы белой листьев экстракта густого в количестве $0,710 \pm 0,018\%$.

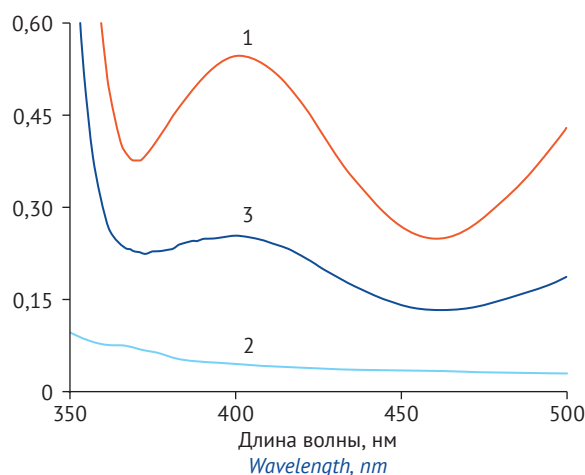


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the author using their own data

Рис. 1. УФ-спектры ацетоновых растворов с добавкой соли Рейнеке: 1 – стандартный образец холин-хлорида; 2 – модельная смесь капель ушных без омелы белой листьев экстракта густого; 3 – капли ушные, содержащие омелы белой листьев экстракта густого

Fig. 1. UV spectra of acetone solutions of choline chloride (1), ear drops without *V. album* leaf soft extract (2), and ear drops with *V. album* leaf soft extract (3) with the addition of Reinecke's salt

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Horton GA, Simpson MTW, Beyea MM, Beyea JA. Cerumen management: An updated clinical review and evidence-based approach for primary care physicians. *J Prim Care Community Health*. 2020;11:2150132720904181. <https://doi.org/10.1177/2150132720904181>
- Roeser RJ, Ballachanda BB. Physiology, pathophysiology, and anthropology/epidemiology of human ear canal secretions. *J Am Acad Audiol*. 1997;8(6):391–400. PMID: 9433685
- Clegg AJ, Loveman E, Gospodarevskaya E, Harris P, Bird A, Bryant J, et al. The safety and effectiveness of different methods of earwax removal: A systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2010;14(28):1–192. <https://doi.org/10.3310/hta14280>
- Schwartz SR, Magit AE, Rosenfeld RM, Ballachanda BB, Hackell JM, Krouse HJ, et al. Clinical practice guideline (update): earwax (cerumen impaction). *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2017;156:1–29. <https://doi.org/10.1177/0194599817725542>
- Aaron K, Cooper TE, Warner L, Burton MJ. Ear drops for the removal of ear wax. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;7(7):CD012171. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012171.pub2>
- Позднякова АЕ, Адзияхметова СЛ, Сергеева ЕО, Поздняков ДИ, Юртаева ЕА, Бородин ИО, Компанцев ДВ. Разработка состава и технологии капель ушных церуменолитического действия на основе омелы белой листьев экстракта густого. *Фармация и фармакология*. 2023;11(6):482–93. Pozdnyakova AE, Adzhiakhmetova SL, Sergeeva EO, Pozdnyakov DI, Yurtaeva EA, Borodina IO, Kompantsev DV Composition and technology development of ear drops with cerumenolytic action (based on thick *Viscum album* L. leaves extract). *Pharmacy & Pharmacology*. 2023;11(6):482–93 (In Russ.). <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2023-11-6-482-493>
- Поздняков ДИ, Адзияхметова СЛ, Червонная НМ, Оганесян СО. Сравнительное изучение фенольного состава и антиоксидантной активности полупаразита *Viscum album* L. и листьев растений – хозяев *Malus domestica* Borkh., *Pyrus communis* L. *Химия растительного сырья*. 2023;1(1):287–96. Pozdnyakov DI, Adzhiakhmetova SL, Chervonnaya NM, Oganessian SO. Comparative study of the phenolic composition and antioxidant activity of the hemiparasitic plant *Viscum album* L. and leaves of host plants *Malus domestica* Borkh. and *Pyrus communis* L. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2023;1(1):287–96 (In Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.20230110947>
- Pozdnyakov DI, Adzhiakhmetova SL, Popova OI, Oganessian ET. Choline accumulation in mistletoe leaves (*Viscum album* L.) and the effect of extracts based on them on the course of the sporadic form of Alzheimer's disease in experimental animals. *Arab J Med Aromat Plants*. 2023;9(1):1–22. <https://doi.org/10.48347/IMIST.PRSM/aj-map-v9i1.33916>
- Бубенчикова ВН, Степнова ИВ. Изучение азотсодержащих соединений горюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.). *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016;11(6):1133–5. Bubenichikova VN, Stepnova IV. Investigation of nitrogen-containing compounds of *Picris hieracioides* L. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2016;11(6):1133–5 (In Russ.). EDN: [XBVUYZ](https://doi.org/10.14258/jcprm.20230110947)
- Гусев НФ, Петрова ГВ, Докучаева ЮА, Немерешина ОН. Содержание холина в растениях земляники зеленой южного предуралья. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2013;1(1):221–4. Gusev NF, Petrova GV, Dokuchaeva YuA, Nemereshina ON. Choline content in green strawberry plants of the southern Cisuralian Region. *News of the Orenburg State Agrarian University*. 2013;1(1):221–4 (In Russ.). EDN: [PWNXJR](https://doi.org/10.14258/jcprm.20230110947)
- Муравьева ДА, Попова ОИ, Вартанян КО. Азотистые основания омелы белой и формианы простой. *Фармация*. 1991;40(1):16–7. Muravyova DA, Popova OI, Gasparyan KO. Nitrogenous bases of *Viscum album* L. and *Firmiana simplex*. *Pharmacy*. 1991;40(1):16–7 (In Russ.). EDN: [YNDSOH](https://doi.org/10.14258/jcprm.20230110947)
- Позднякова ТА, Бубенчиков РА. Изучение азотсодержащих соединений герани болотной. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2015;11(1):37–9. Pozdnyakova TA, Bubenichikov RA. Study of nitrogen-containing compounds of the herb *Geranium palustre* L. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2015;11(1):37–9 (In Russ.). EDN: [WFRPOV](https://doi.org/10.14258/jcprm.20230110947)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Вклад авторов распределен следующим образом: С.Л. Адзияхметова – проведение эксперимента, написание текста рукописи, статистическая обработка данных, формулировка заключения; А.Е. Позднякова – написание текста рукописи, участие в формулировании выводов, работа с источниками литературы, 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. Similla L. Adzhiakhmetova conducted the experiment, drafted the manuscript, performed statistical data processing, and formulated the conclusions. Anastasiya E. Pozdnyakova drafted the manuscript, formulated the conclusions, worked with references, and approved the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Адзияхметова Симила Леонтьевна, канд. фарм. наук / **Similla L. Adzhiakhmetova**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9685-1384>

Позднякова Анастасия Евгеньевна, канд. фарм. наук / **Anastasiya E. Pozdnyakova**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0328-0127>

Поступила 17.06.2024

После доработки 15.10.2024

Принята к публикации 21.10.2024

Online first 31.01.2025

Received 17 June 2024

Revised 15 October 2024

Accepted 21 October 2024

Online first 31 January 2025



С.Э. Эрдни-Гаряев¹ 
Д.Д. Мамедов¹ 
Д.С. Юрочкин¹  
Д.Д. Зеликова¹ 
З.М. Голант¹ 
В.С. Фисенко²,
И.А. Наркевич¹ 

Нормативное правовое регулирование изготовления лекарственных препаратов аптечными организациями на немецком фармацевтическом рынке.

Часть 2. Особенности организации деятельности (обзор)

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Профессора Попова, 14, лит. А, Санкт-Петербург, 197022, Российская Федерация

² Министерство здравоохранения Российской Федерации, Рахмановский пер., д. 3, ГСП 4, Москва, 127994, Российская Федерация

✉ Юрочкин Дмитрий Сергеевич; dmitry.yurochkin@pharminnotech.com

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время в Российской Федерации поставлена задача по восстановлению системы производственных аптек как элемента критически значимой инфраструктуры здравоохранения и лекарственного обеспечения населения страны. Для совершенствования регуляторной практики, разработки и внедрения новых передовых подходов при изготовлении и контроле качества лекарственных препаратов (ЛП) аптечного изготовления, необходимо изучить соответствующие положения, посвященные надлежащим практикам изготовления ЛП в зарубежных системах здравоохранения.

ЦЕЛЬ. Анализ организации деятельности и ее нормативного регулирования в сфере изготовления ЛП в Германии для формирования предложений по разработке и внедрению отечественных правил надлежащей практики изготовления и отпуска ЛП.

ОБСУЖДЕНИЕ. В работе представлено продолжение комплексного исследования законодательства Федеративной Республики Германии, которое уточняет особенности действующих положений системы надлежащих практик аптечного изготовления ЛП. Рассмотрены различия подходов при изготовлении ЛП медицинскими и фармацевтическими работниками. Выявлено, что изготовление ЛП врачами реализуется в соответствии с принципами «свободы медицинской практики» и осуществляется фактически без какого-либо регуляторного воздействия. Все аптечные организации являются производственными, что позволяет повысить физическую доступность населения к ЛП. Выявлены особенности системы обеспечения качества, которая основывается на процессном подходе – включает контроль процессов изготовления и описывает методики контроля качества ЛП, в том числе применимость экспресс-методик при изготовлении ЛП. Немецкая концепция надлежащих аптечных практик позволяет осуществлять фармацевтическую разработку экстенпоральных ЛП с использованием доступных инструментов валидации, квалификации, верификации и допускает проведение внутриаптечного контроля качества вне производственной аптеки, изготовившей ЛП. Концепции определения уровней риска позволяют производственным аптекам формировать собственные программы отбора проб. Описаны подходы и требования к организации процессов проведения фармацевтической экспертизы. Установлено, что аптечные организации вправе самостоятельно устанавливать сроки годности на изготавливаемую номенклатуру ЛП.

ВЫВОДЫ. Отдельные практические решения, реализованные в аптечной практике Федеративной Республики Германии, имеют высокую практическую значимость, могут быть использованы при разработке и внедрении российских правил надлежащей практики изготовления и отпуска ЛП, в частности: проведение внутриаптечного контроля качества вне производственной аптеки, изготовившей ЛП; полноценная фармацевтическая разработка технологий изготовления ЛП и методик контроля качества, в том числе экспресс-методик, с использованием доступных производителям лекарственных средств инструментов валидации, квалификации, верификации; самостоятельное установление аптечными организациями сроков годности на изготавливаемую номенклатуру экстермпоральных ЛП; формирование аптечными организациями собственных программ отбора проб.

Ключевые слова: законодательство; ФРГ; Германия; изготовление лекарственных препаратов; отпуск лекарственных препаратов; персонализированная медицина; производственные аптеки; экстермпоральные лекарственные препараты; регуляторная практика; аптечные организации

Для цитирования: Эрдни-Гаряев С.Э., Мамедов Д.Д., Юрочкин Д.С., Зеликова Д.Д., Голант З.М., Фисенко В.С., Наркевич И.А. Нормативное правовое регулирование изготовления лекарственных препаратов аптечными организациями на немецком фармацевтическом рынке. Часть 2. Особенности организации деятельности (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(1):63–81. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Sergey E. Erdni-Garyayev¹ 
Devi D. Mamedov¹ 
Dmitry S. Yurochkin¹  
Daria D. Zelikova¹ 
Zakhar M. Golant¹ 
Victor S. Fisenko²,
Igor A. Narkevich¹ 

Pharmacy Compounding Regulation in the German Pharmaceutical Market. Part 2. Organisational Features (Review)

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University,
14A Professor Popov St., St Petersburg 197376, Russian Federation

² Ministry of Health of the Russian Federation,
3 Rakhmanovsky Ln., City Service Post Office-4, Moscow 127994,
Russian Federation

✉ **Dmitry S. Yurochkin;** dmitry.yurochkin@pharminnotech.com

ABSTRACT

INTRODUCTION. The Russian Federation has decided to restore the system of compounding pharmacies as an element of the critical national healthcare infrastructure and pharmaceutical supply chain. To improve Russian regulatory practices, develop novel advanced approaches to pharmacy compounding and quality control, and implement these approaches, it is necessary to study relevant good compounding practices applied in healthcare systems of other countries.

AIM. This study aimed to analyse the German experience in the organisation and regulation of pharmaceutical compounding to suggest recommendations for the development and implementation of Russian guidelines on good compounding and dispensing practices.

DISCUSSION. This work continues a comprehensive study that delves into the current provisions of German legislation governing the system of good compounding practices. This article examines the differences between approaches to compounding by medical and pharmaceutical specialists. According to the findings, compounding by medical specialists is guided by the “free practice of medicine” principle and is subject to minimal regulatory oversight. All pharmacy organisations operate as compounding pharmacies, thereby enhancing the physical accessibility of compounded medicinal products to the population. The authors highlight the features of a process-based quality assurance system encompassing production process controls and quality control methods for compounded medicinal products. Additionally, the authors discuss the applicability of rapid test methods to compounding.

In accordance with the German concept of good pharmacy practices, a compounding pharmacy may use the available validation, qualification, and verification tools in the pharmaceutical development of compounded medicinal products and may outsource its internal quality control function. Using the concept of risk ranking, compounding pharmacies may design their own sampling programmes. The article describes approaches to and requirements for organising the evaluation of compounding prescriptions. In Germany, compounding pharmacies may independently assign shelf lives to the compounded medicinal products they produce.

CONCLUSIONS. Some German solutions are of considerable practical importance and are applicable to the development and implementation of Russian guidelines on good compounding and dispensing practices. In particular, pharmacy organisations may outsource the quality control of their compounded medicinal products. Additionally, pharmacies can conduct the full-scale pharmaceutical development of compounding technologies and quality control methods (including rapid test methods) using the validation, qualification, and verification tools available to drug manufacturers. Moreover, pharmacy organisations may independently assign shelf lives to the compounded medicinal products they produce. Finally, pharmacy organisations may design their individual sampling programmes.

Keywords: legislation; Federal Republic of Germany; Germany; pharmaceutical compounding; dispensing of drugs; personalised medicine; compounding pharmacies; extemporaneous preparations; compounded medicinal products; regulatory practice; pharmacy organisations

For citation: Erdni-Garyaev S.E., Mamedov D.D., Yurochkin D.S., Zelikova D.D., Golant Z.M., Fisenko V.S., Narkevich I.A. Pharmacy compounding regulation in the German pharmaceutical market. Part 2. Organisational features (Review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(1):63–81. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590>

Funding. The study was carried out without external funding.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в Российской Федерации поставлена задача по восстановлению системы производственных аптек как элемента критически значимой инфраструктуры здравоохранения и лекарственного обеспечения населения страны.

В первой части исследования [1] были раскрыты основные императивы законодательства Федеративной Республики Германия (далее — Германия, ФРГ) об обращении лекарственных средств (ЛС), продемонстрированы различия российского и немецкого законодательства, в том числе относительно лингвистических единиц фармацевтических терминов и определений, а также их значений. Так, в нормативном поле Германии фармацевтические субстанции (далее — АФС) являются отдельной сущностью и не входят в дефиницию ЛС, в свою очередь, последние представлены в виде составных ЛС (далее — РЭЛП), а также готовых лекарственных препаратов, состоящих из зарегистрированных лекарственных препаратов (готовых лекарственных форм; далее — ГЛФ) и внутриаптечной заготовки (ВАЗ). Описанное значительно отличается от понятийного аппарата Федерального закона Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (ФЗ-61), где изготавливаемые

лекарственные препараты (далее — экстермпоральные лекарственные препараты, ЭЛП) являются лекарственными препаратами (ЛП) и могут быть изготовлены индивидуально для пациента или группы пациентов по факту поступления рецепта на ЛП, а также требования медицинской организации (МО), или предварительно изготовлены в виде ВАЗ. Настоящая статья продолжает сравнительное исследование немецкого права в сфере отношений, связанных с изготовлением ЛС в аптечных организациях.

Цель работы — анализ организации деятельности и ее нормативного регулирования в сфере изготовления лекарственных препаратов в Германии для формирования предложений по разработке и внедрению отечественных правил надлежащей практики изготовления и отпуска лекарственных препаратов.

Задачи исследования:

- детализировать отличия деятельности по изготовлению ЛП медицинскими и фармацевтическими работниками;
- определить особенности системы обеспечения качества, включающей контроль процессов изготовления и методы контроля качества ЛП, в том числе экспресс-методы, при изготовлении ЛП;

- выявить подходы и требования к организации процессов проведения фармацевтической экспертизы, основывающиеся на принципах взаимодействия медицинских и фармацевтических работников;
- провести анализ практики установления сроков годности на изготавливаемые ЛП, а также контроля качества ЛП.

В работе проведен анализ нормативных правовых документов и баз данных Германии (Gesetze im Internet¹), судебных решений, опубликованных в базе Dejure², статистических данных, доступных в открытых источниках. Поиск осуществлялся за период 1949 (год принятия основного закона ФРГ) – 2023 гг. по следующим поисковым словам: «Wirkstoffe», «Rekonstitution eines Fertigarzneimittels», «Apotheke», «Anerkannte pharmazeutische Regeln», «Deutschen Arzneibuch», «freiverkäufliche Arzneimittel», «Rahmen des üblichen Apothekenbetriebes», «Standardzulassung», «Deutscher Arzneimittel-Codex / Neues Rezeptur-Formularium», «Arzneimittelpreisverordnung».

Необходимо упомянуть, что в немецком законодательстве для обозначения изготовления ЛП и производства ЛС используется один и тот же термин (нем. Herstellen), и далее по тексту предложено использовать такие понятия, как «изготовление ЛП», «производство ЛС», «производство (изготовление)» в зависимости от контекста описываемых положений немецкого законодательства. Также во избежание двойного толкования определений специализации фармацевтических работников необходимо отметить, что в большей части стран мира фармацевт – это специалист с высшим фармацевтическим образованием (в Российской Федерации – провизор), а помощник фармацевта – специалист со средним фармацевтическим образованием (в Российской Федерации – фармацевт). По всему тексту публикации под дефиницией «фармацевт» следует понимать «провизор».

Авторы подчеркивают, что данная работа выполнена в виде двух взаимосвязанных статей и рекомендуют комплексно рассматривать изучение вопросов изготовления ЛП аптечными

организациями в рамках немецкого законодательства. Авторы статьи настоятельно рекомендуют читателю ознакомиться с первой частью проведенных изысканий [1], без чего будет достаточно проблематично понять содержание настоящей публикации, которая описывает систему надлежащих аптечных практик действующей на территории Германии.

В целом исследование является продолжением цикла работ авторов, которые посвящены формированию единой гармонизированной системы нормативного правового регулирования в области обращения ЛП, изготавливаемых аптечными организациями (АО) в Российской Федерации (см., например, [1–3]).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Изготовление лекарственных препаратов врачами

Врач в Германии вправе осуществлять медицинскую деятельность в качестве индивидуального предпринимателя [1]³. Согласно Федеральным медицинским правилам от 02.10.1961⁴ врач служит здоровью человека и нации в целом, одновременно медицинская практика по своей природе – «свободная профессия». Последнее выразилось в том, что более чем 30 лет положения действующего на территории Германии закона «О лекарственных средствах» от 24.08.1976 (далее – Закон Германии)⁵ не распространялись на деятельность врачей по изготовлению ЛС.

В 1997 г. Федеральное министерство здравоохранения Германии (далее – Минздрав Германии) запретило под угрозой уголовного преследования использовать вещества, полученные из органов и тканей организма человека или животного при производстве (изготовлении) ЛС в парентеральных лекарственных формах (ЛФ). Четверо врачей, посчитав такое решение ограничивающим их в правах, подали в суд жалобу. Федеральный конституционный суд Германии в 2000 г. в своем решении – 1 BvR 420/97 (далее – Решение ФКС)⁶ установил,

¹ <https://www.gesetze-im-internet.de>

² <https://dejure.org/>

³ В России Национальной ассоциацией управленцев сферы здравоохранения разработан законопроект об индивидуальном правовом статусе практикующего врача, согласно которому такой статус смогут получать специалисты с высшим или средним специальным медицинским образованием, стажем работы по специальности не менее пяти лет. Ведение соответствующего реестра медицинских работников будет осуществлять Федеральная медицинская палата (Калиновский И. В Госдуму направят законопроект об индивидуальном правовом статусе врача. *Медвестник*. 10.04.2024. <https://medvestnik.ru/content/news/V-Gosdumu-napravyat-zakonoproekt-ob-individualnom-pravovom-statuse-vracha.html>)

⁴ Bundesärztleitung. https://www.gesetze-im-internet.de/b_o/index.html

⁵ Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz – AMG). https://www.gesetze-im-internet.de/amg_1976/BJNR024480976.html

⁶ Leitsätze zum Urteil des Ersten Senats vom 16.02.2000. 1 BvR 420/97. https://www.bundesverfassungsgericht.de/SharedDocs/Entscheidungen/DE/2000/02/rs20000216_1bvr042097.html

что изготовление ЛС врачами является «традиционной областью их деятельности» и «существенной частью свободы медицинской практики». Введенный запрет, кроме того, противоречил ч. 19 ст. 74 Конституции Германии⁷, по смыслу которой под надзор федеральных органов государственной власти не подпадают ЛС, изготавливаемые врачами, поскольку их обращение не является отпуском или реализацией (продажей) ЛС.

Решение ФКС привело к тому, что в 2002 г. в Закон Германии были внесены поправки, согласно которым деятельность по изготовлению ЛС врачами для своих пациентов признавалась не регулируемой законодательством об обращении ЛС. Позже Рабочая группа Бундестага и Бундесрата по модернизации федерального государственного устройства (нем. Kommission von Bundestag und Bundesrat zur Modernisierung der bundesstaatlichen Ordnung) представила доклад⁸, содержащий оценку полномочий федеральных органов государственной власти в сфере обращения ЛС, согласно которой ч. 19 ст. 74 Конституции Германии противоречит принципам охраны здоровья граждан. В 2003 г. в результате деятельности совместной комиссии Бундестага и Бундесрата по модернизации федерального государственного устройства было принято решение о расширении полномочий федеральных органов государственной власти в отношении изготавливаемых врачами ЛС. Соответствующие поправки были внесены в Конституцию Германии в 2006 г., переходный период изменений занял 3 года и завершился корректировкой Закона Германии в 2009 г.

На сегодняшний день основными документами, регулирующими деятельность АО по изготовлению ЛС, являются закон «Об аптечных организациях» от 20.08.1960 (далее – Закон об аптеках)⁹ и постановление Минздрава Германии «О работе аптечных организаций» от 09.02.1987 (далее – Постановление НАП)¹⁰, однако в отношении изготовления ЛС врачами установленные нормативные правовые требования отсутствуют.

Врач, осуществляющий изготовление ЛС, обязан уведомить об этом региональный орган исполнительной власти (ч. 1–2 ст. 67 Закона Германии),

указав наименование и состав ЛС. Содержание и форма такого уведомления без получения лицензии на производство ЛС не унифицированы и различаются в разных регионах. Основная информация, которая должна быть в указанном уведомлении, помимо наименований и состава ЛС включает: ФИО врача, контактную информацию; адрес осуществления деятельности по изготовлению ЛС; заявление врача, что все ЛС изготавливаются исключительно под его прямую профессиональную ответственность с целью личного назначения и применения у конкретного пациента. Некоторые региональные органы исполнительной власти дополнительно запрашивают информацию: о квалификации сотрудников, задействованных при изготовлении ЛС¹¹; об используемых АФС и их поставщиках; о производственном оборудовании; о соблюдении положений признанных фармацевтических правил [1].

Сроки предоставления ответа от компетентного регионального органа исполнительной власти и размер пошлины варьируются в зависимости от сложности состава, лекарственной формы ЛС, а также региона Германии.

Изготовление лекарственных препаратов аптечными организациями

Согласно Постановлению НАП все АО Германии, за исключением аптек-филиалов [1], должны иметь техническую возможность самостоятельно изготавливать ЛС, а также проводить контроль качества АФС и вспомогательных веществ (далее – ВВ).

В ст. 1а Постановления НАП установлены следующие термины и определения, касающиеся изготовления ЛС:

- исходное сырье (нем. Ausgangsstoff) – любое вещество, используемое при изготовлении ЛС, за исключением упаковочного материала;
- индивидуальная переупаковка для пациента (нем. Patientenindividuelles Stellen) – ручная переупаковка ГЛФ в многодозовую упаковку;
- индивидуальная блистерная переупаковка (нем. Patientenindividuelles Verblistern) – ручная или машинная (автоматизированная) переупаковка ГЛФ в блистер (таблетницу);

⁷ Grundgesetz für die Bundesrepublik Deutschland. <https://www.gesetze-im-internet.de/gg/BJNR00010949.html>

⁸ https://www.bundesrat.de/DE/plenum/themen/foekol/bundesstaatskommission/unterlagen/AU-002.pdf?__blob=publicationFile&v=1

⁹ Gesetz über das Apothekenwesen. https://www.gesetze-im-internet.de/apog/_2.html

¹⁰ Verordnung über den Betrieb von Apotheken (Apothekenbetriebsordnung – ApBetrO). https://www.gesetze-im-internet.de/apobetro_1987/ApBetrO.pdf

¹¹ Anzeige gemäß § 67 Absatz 1 und 2 Arzneimittelgesetz (AMG) für die erlaubnisfreie Herstellung von Arzneimitteln durch ärztliche, zahnärztliche sowie andere zur Ausübung der Heilkunde bei Menschen befugte Personen gemäß § 13 Absatz 2b AMG und die erlaubnisfreie Herstellung von Gewebe und Gewebezubereitungen durch ärztliche Personen gemäß § 20d AMG. https://www.berlin.de/lageso/gesundheitspharmaziewesen-und-medizinprodukte/arzneimittelwesen/vorlage_anzeige_-67.docx?ts=1685105902

- внутриаптечный контроль — определенные процедуры в отношении контроля качества ЭЛП, включающие в себя мониторинг окружающей среды (температура, влажность, микробиологическая чистота, содержание частиц в воздухе и т.д.);
- калибровка (нем. Kalibrierung) — операция, посредством которой при точно определенных условиях устанавливается соотношение, с одной стороны, значений, отображаемых измерительным прибором (системой) или полученных в результате измерения материала, и, с другой стороны, соответствующих значений эталонного стандарта;
- квалификация (нем. Qualifizierung) — предоставление документально подтвержденных доказательств, демонстрирующих с высокой степенью достоверности, что конкретная единица оборудования или конкретные условия окружающей среды для изготовления или испытания ЛС соответствуют ранее установленным требованиям качества;
- валидация (нем. Validierung) — предоставление документально подтвержденных доказательств, демонстрирующих с высокой степенью уверенности, что ЛС изготовлен и испытан с использованием определенного процесса или стандартной операционной процедуры, которые соответствуют ранее установленным требованиям качества;
- изготовление в закрытой системе — перенос стерильных исходных материалов или растворов в предварительно стерилизованную закрытую емкость без контакта содержимого с внешней средой (изоляционные технологии: ламинарные шкафы, фармацевтические изоляторы и др.).

В Германии при изготовлении ЛС используются в том числе АФС и ГЛФ. Прямой законодательный запрет на изготовление ГЛФ отсутствует, что подтверждается арбитражной практикой. Например, согласно решению Высшего земельного суда Гамбурга от 18.12.2015¹² изготовление ЛС зависит исключительно от конкретного рецепта для пациента, при этом изготовление ЛС возможно из ГЛФ. Подобная интерпретация «привилегии ЭЛП» (нем. Rezepturprivileg) вытекает из ч. 1 ст. 3 Директивы 2001/83/EC¹³ и связанного с ней решения Европейского суда

от 16.07.2015¹⁴, согласно решению Окружного суда Гамбурга от 04.02.2021¹⁵.

Система обеспечения качества экстенпоральных лекарственных препаратов. В соответствии с пояснительной запиской к четвертым поправкам в Постановление НАП от 3 февраля 2012 г.¹⁶ (далее — 4-е поправки Постановления НАП) вносимые ими изменения представляют собой значительное обновление немецкой концепции изготовления ЛС, гармонизированное с современными представлениями о данном виде деятельности и разработанное на основании резолюции Комитета министров Совета Европы «О требованиях к обеспечению качества и безопасности лекарственных средств, изготавливаемых в аптеках для особых нужд пациентов» (далее — Резолюция ResAP) [2].

Указанными выше поправками Постановления НАП установлены требования по наличию системы менеджмента качества, разработанной и утвержденной в каждой АО. По смыслу п. 2а Постановления НАП заведующий аптекой несет ответственность за качество изготовленных в аптеке ЛС, а также за разработку системы менеджмента качества (нем. Qualitätsmanagementsystem; далее — СМК). Для функционирования СМК должны быть сформированы стандартные операционные процедуры, обеспечивающие изготовление, контроль качества и хранение ЛС в соответствии с действующими стандартами. Заведующий аптекой отвечает за проведение самоинспекций, кроме того, АО обязана не реже 1 раза в год проводить контроль качества ЭЛП в аккредитованных испытательных лабораториях (центрах). В Германии развита система добровольной сертификации СМК аптечных организаций региональными палатами фармацевтов [1] согласно стандарту ISO 9001¹⁷. При этом Федеральная палата фармацевтов определила единые требования к органу по сертификации, процессу сертификации и аудиторам. На сегодняшний день единым требованиям соответствуют только 7 из 17 региональных палат фармацевтов.

СМК — непрерывный процесс, охватывающий все сферы деятельности АО, служит основой для поддержания и постоянного улучшения качества оказываемых фармацевтических услуг.

¹² OLG Hamburg, Urteil vom 18.12.2015 — 3 U 43/14. <https://openjur.de/u/934358.html>

¹³ Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02001L0083-20220101>

¹⁴ InfoCuria Case-law. 16.07.2015 — C-544/13 — Abcur. <https://curia.europa.eu/juris/liste.jsf?&num=C-544/13>

¹⁵ LG Hamburg, Urteil vom 04.02.2021 — 312 O 112/20. <https://openjur.de/u/2333565.html>

¹⁶ Vierte Verordnung zur Änderung der Apothekenbetriebsordnung. <http://www.bundesrat.de/drs.html?id=61-12>

¹⁷ ГОСТ Р ИСО 9001-2015. Системы менеджмента качества.

Исходя из положений пп. 4а, 7 и 8 Постановления НАП, требований немецкого национального формуляра (нем. Deutscher Arzneimittel-Codex / Neues Rezeptur-Formularium; далее – Формуляр DAC/NRF)¹⁸, заведующий аптекой утверждает следующие виды инструкций, входящие в СМК аптечной организации (включая, но не ограничиваясь): инструкцию по изготовлению (нем. Herstellungsanweisung); инструкцию по санитарному режиму (нем. Hygieneplan); инструкцию по испытаниям (нем. Prüfanweisung); систему управления рисками при контроле качества БАЗ (нем. Prüfung von Defekturzneimitteln nach Risikomanagement).

В силу п. 4 Постановления НАП производственные помещения АО должны соответствовать определенному типу, размеру, расположению, иметь оборудование, необходимое для изготовления ЛС, обеспечивать надлежащую работу производственных аптек: подготовительные работы, изготовление, контроль качества, упаковку, хранение, а также транспортировку (доставку) ЛС. Производственные помещения должны быть отделены от других помещений аптеки; обеспечены необходимой системой кондиционирования, вентиляции, отвечать требованиям освещенности рабочих мест; быть контролируемые, то есть подвергаться мониторингу окружающей среды.

Минимальным набором помещений АО являются торговый зал; ассистентская, оборудованная вытяжным шкафом; помещения для хранения исходного сырья и ЛС; комнаты ночного дежурства. Общая площадь указанных помещений должна составлять не менее 110 м². При расчете площади производственной аптеки не учитываются помещения для индивидуальной переупаковки ЛС, а также чистые помещения для изготовления стерильных ЛС.

Для изготовления нестерильных ЛС должна быть выделена отдельная рабочая зона с трехсторонними перегородками, за исключением случаев, когда рабочая зона находится непосредственно в ассистентской. Стены и поверхности, а также пол должны легко очищаться, чтобы свести к минимуму риск загрязнения окружающей среды изготавливаемыми ЛС. Аптеки-филиалы должны состоять как минимум из торгового зала, помещения для хранения ЛС и комнаты для ночного дежурства.

Каждой производственной аптеке необходимо в обязательном порядке иметь оборудование, предназначенное для изготовления суспензий,

растворов и эмульсий, в том числе в виде капель (глазных, ушных и назальных), мазей, кремов, гелей, паст, капсул, порошков, суппозитория.

В аптечной организации должна быть обеспечена возможность изготовления стерильных ЛС (за исключением парентеральных ЛФ). Если в производственной аптеке отсутствует оборудование для получения воды для инъекций, то изготовление ЛС осуществляется из готовой лекарственной формы воды для инъекций, которая в достаточном количестве должна храниться в материальной комнате.

До 2012 г. Постановление НАП включало в себя Приложение № 1, в котором указывался перечень необходимого оборудования, средств измерений, лабораторной посуды и титрованных растворов. Согласно пояснительной записке к 4-м поправкам в Постановление НАП, Приложение № 1 было отменено в рамках устранения административных барьеров при организации деятельности по изготовлению ЛС, поскольку не представляется возможным создать какие-либо избыточные и достаточные списки чего-либо в рамках производственной деятельности АО ввиду высокого уровня вариативности технологических процессов и номенклатуры ЭЛП. При этом заведующий аптекой по собственному решению может приобрести современное оборудование, соответствующее текущему уровню развития фармацевтической науки, вместо ограничительного перечня, ранее установленного Приложением № 1 к Постановлению НАП.

Исходя из положений п. 4а Постановления НАП изготовление ЛС осуществляется в условиях микробиологического контроля как самих ЭЛП, так и окружающей среды. Заведующий аптекой должен составить инструкцию по санитарному режиму, в которой отображены соответствующие санитарно-эпидемиологические меры в отношении персонала, процессов и производственных помещений. Степень и уровень микробиологического контроля должны быть сформированы исходя из требований, установленных Европейской фармакопеей. Инструкция по санитарному режиму не унифицирована для всех АО и разрабатывается производственной аптекой в рамках СМК самостоятельно.

Согласно п. 6 Постановления НАП ЭЛП должны соответствовать требованиям качества, утвержденным нормативными правовыми документами. Альтернативные методики контроля качества, отличные от тех, которые описаны в Немецкой

¹⁸ DAC/NRF. <https://dacnrf.pharmazeutische-zeitung.de/>

или Европейской фармакопеех (далее — Фармакопея), также могут быть использованы при условии их валидации. Контроль качества ЭЛП может проводиться вне АО под ответственность заведующего аптекой: в компаниях, имеющих лицензию на производство ЛС на территории Германии; в компаниях, имеющих лицензию на производство ЛС на территории государств — членов Европейского союза; в других производственных аптеках, обладающих соответствующей технической возможностью проведения необходимых видов контроля качества; экспертами, имеющими немецкую лицензию на фармацевтическую практику или свидетельство о сдаче экзамена после завершения не менее 4 лет обучения в университете в области фармации, химии, фармацевтической химии и технологии, биологии, медицины человека, а также обладающих практическим опытом работы в сфере контроля качества ЛС не менее 2 лет.

Предприятия или эксперты, ответственные за проведение контроля качества, должны подтвердить, что ЭЛП были проверены согласно признанным фармацевтическим правилам, указав серию, дату и результаты испытаний, в результате чего составляется сертификат испытания (нем. Prüfsertifikat). Непосредственно в АО должна быть как минимум установлена подлинность ЛС и сделаны соответствующие записи о проведенных испытаниях.

В соответствии с п. 7 Постановления НАП РЭЛП должны быть изготовлены по заранее составленным инструкциям для конкретного РЭЛП, в которых указывается технология изготовления и используемое оборудование, методики и виды контроля качества, упаковка и маркировка РЭЛП. Допускается использовать инструкции по изготовлению, разработанные в сторонних организациях после проведения процедуры их верификации в конкретной АО.

Фармацевтическая экспертиза. Перед изготовлением РЭЛП фармацевт должен провести фармацевтическую экспертизу (нем. Plausibilitätsprüfung) рецепта. Данные о фармацевтической экспертизе рецепта и процессе изготовления РЭЛП должны быть задокументированы фармацевтом в протоколе процесса изготовления (нем. Herstellungsprotokoll, аналогично российскому паспорту письменного контроля, далее — ППК), в котором по каждому РЭЛП заполняются: наименование и количество исходного сырья с обозначением их серий или номеров испытаний, параметры процессов изготовления (например, скорость и время перемешивания

смеси), результаты внутриаптечного контроля, ФИО пациента и врача (при наличии рецепта), ФИО пациента (при наличии требования физического лица [1]), ФИО фармацевта, изготовившего РЭЛП.

Фармацевтическая экспертиза рецепта проводится, когда ЛС изготавливается впервые или были опубликованы новые научные данные относительно изготавливаемой номенклатуры ЛС (стабильность, токсичность, несовместимость и др.). Фармацевтическую экспертизу часто встречающихся рецептов не требуется проводить перед каждым отдельным изготовлением, поскольку соответствующая процедура была проведена ранее, а данные по ней указаны в ППК. При этом рекомендуется архивировать документацию по фармацевтической экспертизе в соответствии с действующей СМК аптечной организации, а также присваивать каждой рецептуре краткое наименование для обеспечения быстрого доступа к документации.

Основными элементами фармацевтической экспертизы являются анализы:

- способа применения РЭЛП;
- исходного сырья по наименованию и количеству;
- дозировки;
- значения pH для РЭЛП на водной основе;
- оценки соотношения «польза–риск» РЭЛП, исходя из положений ст. 5 Закона Германии (ЛС считаются потенциально опасными, если существуют научные данные, указывающие на их вредное воздействие при использовании по назначению, превышающее границы, обоснованные медицинской наукой);
- терапевтической концепции (нем. Therapiekonzept) — определения соответствия АФС требуемому способу применения ЭЛП. Например, не эффективное при местном применении производное глюкокортикоидов триамцинолон должно быть заменено на эффективную альтернативу в виде триамцинолона ацетонида;
- стабильности ЛФ — соответствие выписанного состава ЭЛП (включая ВВ при их наличии в рецепте) необходимому сроку годности на курс лечения;
- фармацевтической и фармакологической совместимости исходного сырья;
- изотоничности (для парентеральных ЛФ, глазных, ушных и назальных капель).

В результате проведенных действий делается заключение о возможности изготовления РЭЛП. Фармацевт должен проконсультироваться

с врачом, выписавшим рецепт, если во время проведения фармацевтической экспертизы возникли какие-либо несоответствия по вопросам, перечисленным выше. Замена фармацевтом АФС осуществляется исключительно по согласованию с врачом, ограничение не распространяется на ВВ. Результат консультации с врачом и вытекающие из этого изменения должны быть задокументированы в письменной форме. ППК заверяется подписью фармацевта.

Объем фармацевтической экспертизы может быть уменьшен при изготовлении стандартизированных рецептур Формуляра DAC/NRF, поскольку в нем могут быть данные о совместимости исходного сырья, стабильности ЭЛП, сроков годности [4].

Установление сроков годности. По итогам фармацевтической экспертизы устанавливается срок годности (нем. Haltbarkeit) на ЭЛП. В Германии, согласно Формуляру DAC/NRF, различают следующие понятия по отношению к сроку годности исходного сырья и ЛС:

- срок действия (нем. Laufzeit) — срок годности при условии, что упаковка ЛС еще не была вскрыта;
- дата окончания срока годности (нем. Verfalldatum) — дата, указанная производителем или АО, после которой ЛС нельзя больше принимать или использовать при производстве (изготовлении) ЛС;
- срок использования (нем. Verwendbarkeitsfrist) — период времени, в течение которого исходное сырье, промежуточные продукты, полуфабрикаты, концентрированные растворы, тритурации могут быть использованы при производстве (изготовлении) ЛС в соответствии с надлежащими условиями хранения;
- срок использования после вскрытия (нем. Aufbrauchsfrist) — период времени с момента первого вскрытия упаковки / первого изъятия разовой дозы ЛС, в течение которого их можно принимать пациентам или использовать при производстве (изготовлении) ЛС.

В ходе проверки подлинности исходного сырья АО устанавливает срок использования, поскольку производитель исходного сырья, как правило, указывает срок действия или дату окончания срока годности для запечатанной упаковки. В связи с тем что при проверке подлинности производственной аптекой целостность упаковки нарушается, срок использования никогда

не может быть дольше указанного производителем срока действия и может быть сокращен в случае, если вскрытая упаковка исходного сырья характеризуется коротким сроком действия. Формуляр DAC/NRF предоставляет табличные значения для сроков использования некоторых видов исходного сырья (табл. 1. «Пример установления срока использования исходного сырья в аптечной организации Германии»). Опубликована на сайте журнала¹⁹).

Согласно п. 14 Постановления НАП, ЭЛП должны быть промаркированы с указанием срока использования и, при необходимости, срока использования после вскрытия упаковки. В формуляре DAC/NRF в отношении РЭЛП используется термин «срок действия» вместо термина «срок использования», указанного в тексте Постановления НАП, что позволяет однозначно разделить исходное сырье. Указание срока действия после вскрытия упаковки соответствует сроку использования после вскрытия РЭЛП. Большая часть РЭЛП представляет собой многодозовые контейнеры, в таких случаях срок действия теряет свою значимость в отличие от срока использования после вскрытия.

Срок действия и срок использования после вскрытия для стандартизированных рецептур указан в Формуляре DAC/NRF; кроме того, в нем также представлены справочные данные и рекомендуемые сроки использования после вскрытия для ЭЛП, характеризующихся физико-химической стабильностью при их хранении в многодозовых упаковках. При проведении фармацевтической экспертизы должны проводиться дифференциация параметров ЛФ, первичной упаковки, риска микробной контаминации, в соответствии с чем также определяются сроки годности. Таким образом, АО вправе самостоятельно установить срок годности ЭЛП без проведения исследований на стабильность на основании научных данных о стабильности отдельных компонентов ЛС, их физико-химических свойств и взаимодействий, а также проводить собственные исследования на стабильность конкретных рецептур.

Немаловажным фактором, оказывающим влияние на срок годности²⁰ ЛС, является наличие воды: кремы, гидрогели или водные растворы более восприимчивы к микробной контаминации, чем липофильные ЛФ. Согласно Формуляру DAC/NRF, ЛС, не содержащие консервантов,

¹⁹ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table1>

²⁰ Здесь и далее по тексту «срок годности» — собирательный термин, включающий срок действия и срок использования после вскрытия, поскольку аптечная организация должна указать эти данные в зависимости от вида экстермпорального лекарственного препарата.

то есть со сроком годности менее 28 сут, не должны изготавливаться как ВАЗ. Максимально возможные сроки годности ЭЛП в различных ЛФ представлены в *таблице 2 «Максимальные сроки годности некоторых лекарственных форм экстенпоральных лекарственных препаратов в Германии»*, опубликованной на сайте журнала²¹.

Согласно требованиям Фармакопеи исходное сырье должно соответствовать качественным и количественным характеристикам, указанным в спецификации. То есть по состоянию на последний день срока годности количественное содержание веществ должно составлять ≈100% (показатель качества, уменьшающегося во времени; далее – критерий приемлемости). Для ГЛФ критерий приемлемости составляет 95% согласно Фармакопее, в то же время для ЭЛП критерий приемлемости составляет 90% исходя из требований Формуляра DAC/NRF. Таким образом, в случаях, когда используется ГЛФ в качестве исходного сырья при изготовлении ЭЛП, необходимо учитывать остаточный срок годности ГЛФ. Например, если используемая ГЛФ имеет срок использования 4 недели после вскрытия, то срок годности ЭЛП не должен превышать 4 недели.

Процессы изготовления и контроля качества экстенпоральных лекарственных препаратов.

Проведение полного химического контроля может не осуществляться в том случае, если качество РЭЛП гарантируется технологическим процессом изготовления (нем. *Herstellungsverfahren*), органолептическим контролем ЛС, а также в случаях, если это предусмотрено результатами внутрипроцессного контроля (нем. *Inprozesskontrollen*) – набора испытаний, которые осуществляются в критических точках процесса изготовления ЛС и гарантируют получение ЭЛП надлежащего качества. Кроме того, внутрипроцессный контроль обязателен при изготовлении стерильных ЭЛП (как минимум, мониторинг окружающей среды). Другими примерами внутрипроцессного контроля являются бесконтактное измерение температуры с помощью инфракрасного лазерного термометра; визуальный контроль однородности структуры и физической стабильности; контроль цвета, запаха, значения pH; контроль плотности, насыпной плотности; проверка целостности фильтра путем испытания на определение насыщенности («точка пузырька») при стерилизующей

фильтрации; контроль в процессе изготовления, в том числе для ЛС, изготовленных с использованием автоматизированных систем перемешивания.

Изготовление ЭЛП осуществляется согласно «принципу четырех глаз» (нем. 4-Augen-Prinzip), сопоставимым с российским правилом «изготовления под наблюдением провизора-технолога или провизора-аналитика в случае отсутствия методик контроля качества»²², однако в данном контексте речь идет не только про физическое наблюдение за изготовлением конкретного ЛС. При этом, одновременное изготовление ЛС в АО на различных производственных участках требует регулярного контроля вне зависимости от видов ЛФ. Таким образом, «принцип четырех глаз» в первую очередь подразумевает под собой надлежащий уровень контроля за процессами изготовления ЛС.

На *рисунке 1*²³ представлена блок-схема принятия решения по изготовлению РЭЛП.

Процесс изготовления и контроля качества внутриаптечной заготовки. Согласно п. 8 Постановления НАП, ВАЗ, аналогично РЭЛП, изготавливается в соответствии с предварительно (заранее) разработанными инструкциями по изготовлению. В отличие от РЭЛП, ВАЗ считается готовым лекарственным препаратом, поэтому в инструкции по изготовлению также должна быть указана информация, каким образом препарат вводится в гражданский оборот (основание для изготовления и отпуска ВАЗ: рецепт, требование физического лица, договор поставки или «стандартное разрешение» [1]). При изготовлении ВАЗ информация также фиксируется в ППК, в котором должны быть указаны дата изготовления и номер серии; наименование и количество исходного сырья с обозначением серии или номера испытания; результаты внутриаптечного контроля; параметры процессов изготовления; количество изготовленных единиц или разведенных (восстановленных) ГЛФ [2]; срок годности; подпись лица, изготовившего ВАЗ.

Для внутриаптечного контроля ВАЗ разрабатывается соответствующая инструкция по испытаниям, содержащая подробную информацию об отборе проб, методиках проводимых исследований и др. По итогам проверки контроля

²¹ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table2>

²² Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 22.05.2023 № 249н «Об утверждении правил изготовления и отпуска лекарственных препаратов для медицинского применения аптечными организациями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность».

²³ Англоязычная версия *рисунка 1* размещена на сайте журнала (English translation of *Figure 1* is available at the website of the journal). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-fig1>

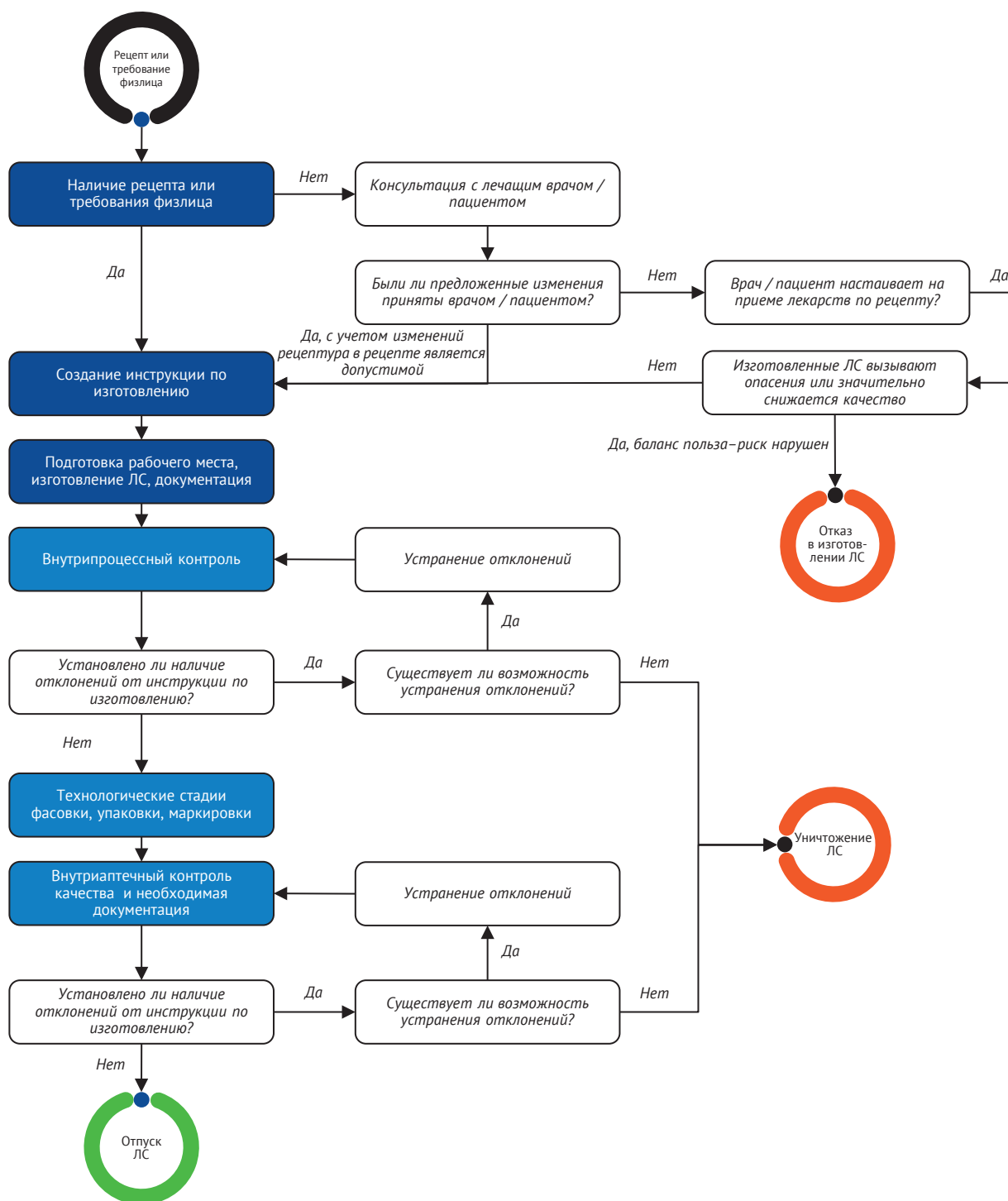


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 1. Блок-схема изготовления составных лекарственных препаратов. ЛС – лекарственное средство

Fig. 1. Flowchart for compounding extemporaneous formulations²³

качества ВАЗ оформляется протокол испытаний (нем. Prüfprotokoll), который включает в себя дату проведения испытаний, их результаты, подпись и ФИО лица, ответственного за проведение контроля качества, подпись и ФИО

заведующего аптекой. Согласно 4-м поправкам Постановления НАП, протокол испытания – фундаментальная часть признанных фармацевтических правил, в том числе правил Надлежащей производственной практики

(Good Manufacturing Practice, GMP), при этом под внутриаптечным контролем ВАЗ не следует понимать полное аналитическое тестирование (например, согласно требованиям Фармакопеи, включая определение примесей, остаточных растворителей и др.). Текст Постановления НАП не содержит конкретных указаний относительно объема и видов испытаний, в отличие от подхода, реализованного в Фармакопее США [2, 3]. Следует подчеркнуть, что в контексте аптечного изготовления ЛС необходимо учитывать факторы, существенно разграничивающие ЭЛП и ГЛФ. Для ЭЛП характерно единичное изготовление ЛС; меньший размер серии ВАЗ; изготовление ЭЛП исключительно фармацевтическими работниками (в отличие от ГЛФ, где подобное требование отсутствует); отсутствие государственной регистрации ЭЛП, в связи с чем врач, назначивший ЭЛП, а также фармацевтические работники, задействованные при изготовлении ЛС, несут персональную ответственность перед пациентом в пределах своей компетенции.

Сочетание упомянутых факторов обосновывает сокращение объема контролируемых упаковок ЭЛП и видов контроля качества до необходимого минимума. Решение о том, что включает этот минимум, принимает ответственный за изготовление фармацевт или заведующий аптекой. Такие решения должны осуществляться на основе оценки риска при изготовлении ЛС и документироваться для обеспечения прослеживаемости согласно требованиям монографии 2619 «Фармацевтические препараты» Европейской фармакопеи. Оценка уровня риска является предварительным этапом, на основе которого определяются оптимальные методы испытаний ВАЗ до степени, при которой достигается экономическая целесообразность изготовления ЛС.

Таким образом, заведующий аптекой перед изготовлением первой серии ВАЗ должен заранее составить инструкцию по испытаниям, в которой будет отображена оценка уровня риска. При этом заведующий аптекой может самостоятельно разработать систему оценки риска, которая будет определять влияние различных параметров на ВАЗ (например, качество АФС, ВВ и упаковки, процесса изготовления, объем и значимость испытаний, стабильность препарата) или использовать разработанные, нормативно закрепленные концепции (методы) оценки риска. Базовое описание концепции оценки уровня риска при изготовлении ЛС изложено

в Резолюции ResAP [2], в которой предлагается типовая модель оценки с выделением ЭЛП высокого или низкого уровней риска. В *таблице 3 «Критерии принятия решения при оценке риска согласно Резолюции ResAP»* (опубликована на сайте журнала)²⁴ приведены критерии для принятия решения при оценке уровня риска ЭЛП. Каждому критерию присваивают коэффициенты от 1 до 5. Число, полученное в результате умножения этих коэффициентов, указывает на уровень требуемой системы обеспечения качества при изготовлении ЭЛП: если оно превышает 100, ЭЛП относят к категории «препаратов с высоким уровнем риска», если число равно или меньше 100, ЭЛП относят к «препаратам с низким уровнем риска».

В зависимости от результатов оценки риска ЭЛП должны быть задокументированы:

- терапевтическая ценность (ЭЛП по медицинским, фармацевтическим или индивидуальным причинам необходимы для конкретного пациента или для определенной группы населения). К терапевтической ценности ЭЛП в том числе относят ЛФ, дозировку и состав, которые не выпускаются в виде ГЛФ;
- состав ЭЛП;
- внутрипроцессный контроль и контроль качества (отбор проб, аналитические методики, критерии приемлемости и др.);
- результаты опытных серий (информация о фармацевтической разработке, оценке процессов изготовления ЛС, включая контроль качества);
- валидация процессов изготовления ЛС и аналитических методик;
- данные по стабильности;
- инструкция по применению.

На основании Резолюции ResAP в Германии разработаны две концепции оценки уровней риска изготавливаемой номенклатуры ЭЛП: от Рабочей группы фармацевтов Германии (нем. Arbeitsgemeinschaft der Pharmazierate Deutschlands; далее – Ассоциация APD) и Формуляра DAC/NRF.

Ассоциация APD в 2013 году выпустила резолюцию по внутриаптечному контролю ВАЗ (далее – Резолюция APD 2013)²⁵, согласно которой только органолептических испытаний ВАЗ, как при изготовлении РЭЛП, недостаточно. Выбор методов испытаний и их объем зависят от потенциального уровня риска,

²⁴ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table3>

²⁵ Resolution 2013. https://www.pharmazierat.de/logicio/pmws/indexDOM.php?client_id=pharmazierat&page_id=resolutionen2013&lang_iso639=de

связанного с изготовлением ЛС. Для этого в производственной аптеке должна быть создана система управления рисками, в которой заведующий аптекой классифицирует ВАЗ по одной из четырех категорий уровня риска. При этом он должен оценивать риски в отношении дозировки, токсикологического потенциала, терапевтического диапазона и силы действия, способа применения и ЛФ, безопасности процессов изготовления, размеров серии и частоты ее изготовления.

На основании разработанной системы управления рисками заведующий аптекой индивидуально и самостоятельно определяет методы и объем аналитических испытаний с использованием ступенчатой модели (табл. 4)²⁶.

Резолюция APD 2013 устанавливает следующий возможный подход АО при внутриаптечном контроле ВАЗ:

- составление списка и определение категории (степень, уровень) уровня риска ВАЗ;

- выбор методов контроля качества (нем. Prüfmethode) и определение измеряемых параметров в качестве заданных значений (нем. Sollwerten), при этом подходящий метод испытания может потребовать проведения соответствующей процедуры валидации;
- составление регламента испытаний (нем. Prüfvorschrift) с использованием метода испытаний и заданных значений, а также протокола испытаний с фактическими значениями после изготовления ВАЗ. Контроль воспроизводимости;
- обязательное ежегодное проведение внешнего контроля качества ЭЛП.

Несколько иную классификацию представляет Формуляр DAC/NRF, который определяет три уровня риска: низкий, средний и высокий. Для определения соответствующего уровня риска ВАЗ используются критерии Резолюции ResAP, где степень риска оценивается за счет производства значений коэффициентов (табл. 5. «Форма для оценки риска внутриаптечной заготовки

Таблица 4. Категории рисков и примеры внутриаптечного контроля

Table 4. Risk categories and internal quality control examples²⁶

Категория риска	Описание	Внутриаптечный контроль
Низкий	Отсутствуют измеримые критерии риска. Сбор с низкоактивными веществами, ЛФ для наружного применения с низкоактивными веществами. Отсутствует какой-либо риск для здоровья пациента	Визуальная проверка однородности, определение внешнего вида и цвета, определение размера частиц, измерение pH, определение показателя преломления
Средний	Выявлен один из критериев риска или собственная оценка аптечной организации показывает, что необходимы дополнительные испытания. ЛФ для наружного применения: мази, кремы, лосьоны, гели с АФС средней активности (например, глюкокортикоиды 2 и 3 класса). Существует потенциальный риск для здоровья пациента	Измерение pH, определение плотности, объема или веса каплей (стандартный счетчик капель), показателя преломления, дисперсности (микроскопия), размера частиц, испытание вытягиванием на стеклянной пластинке, пенетометрия (консистенция), сухой остаток, экстензометрия, определение коллоидной стабильности. Если целевые значения для этих тестов не могут быть найдены в литературе, они могут быть установлены в аптечной организации
Высокий	Выявлено несколько критериев риска. ЛФ для перорального применения, суппозитории, глазные капли, растворы для внутримышечного полоскания. Существует значительный потенциальный риск для пациента	Все виды испытаний для ЛС «среднего риска», а также полуколичественные и количественные аналитические методы, такие как сравнение цвета и помутнения, оценка размера пятна на хроматографической пластине, однородность веса (весовой тест)
Очень высокий	Выявлены все факторы риска. Парентеральные ЛФ, цитостатические ЛС. Существует значительный потенциальный риск для пациента	Необходимо соблюдать требования п. 35 Постановления Минздрава Германии «О работе аптечных организаций» ²⁷ , «Параметрический выпуск» (нем. Parametrische Freigabe), основанный на валидации процессов изготовления ЛС и мониторинге процесса посредством ежемесячного тестирования на частицы и микробы (помещение, персонал), ежемесячное изготовление модельного ЛС, проверка каждой серии на количественное содержание и стерильность

Таблица составлена авторами по материалам Резолюции Рабочей группы фармацевтов Германии (Arbeitsgemeinschaft der Pharmazierärte Deutschlands) от 16.10.2013

Примечание. ЛФ — лекарственная форма; АФС — фармацевтическая субстанция; ЛС — лекарственное средство.

²⁶ Англоязычная версия таблицы 4 размещена на сайте журнала (English translation of Table 1 is available at the website of the journal). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table4>

²⁷ Verordnung über den Betrieb von Apotheken (Apothekenbetriebsordnung — ApBetrO). https://www.gesetze-im-internet.de/apobetro_1987/ApBetrO.pdf

согласно Формуляру DAC/NRF». Опубликована на сайте журнала)²⁸.

Согласно Формуляру DAC/NRF для ВАЗ с низким уровнем риска используются простые методы физического и химического анализа по определению простых аналитических характеристик, со средним уровнем — простые методы физического и химического анализа, а также методы полного химического контроля (качественный и количественный анализ для действующих веществ у некоторых ЛФ), с высоким — ко всему перечисленному дополнительно осуществляется количественное определение АФС и ВВ.

При разработке методов испытаний и заданных значений заведующий аптекой должен использовать следующие источники информации: Фармакопею США, Британскую или Швейцарскую фармакопею, монографии «стандартных разрешений», действующую Немецкую фармакопею, Формуляр DAC/NRF, научные публикации в рецензируемых и специализированных изданиях.

В соответствии с Формуляром DAC/NRF количество отбираемых упаковок ВАЗ (N) рассчитывается по формуле (1):

$$N = 0,4 \times \sqrt{n}, \quad (1)$$

где n — количество упаковок одной серии ВАЗ.

Приведенная формула аналогична ОФС.1.1.0004 «Отбор проб» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания, однако для малых серий Формуляром DAC/NRF предусмотрены соответствующие округления, где N составляет: до 1,49 — 1 упаковка; от 1,50 до 2,49 — 2 упаковки; от 2,50 до 3,49 — 3 упаковки; >3,50 — 4 упаковки.

В случае использования стандартных рецептов применяются указанные в Формуляре DAC/NRF методики контроля качества.

Несмотря на то что при изготовлении ВАЗ увеличиваются требования к контролю качества, как правило, себестоимость изготовления ВАЗ в пересчете на одну упаковку, по сравнению с РЭЛП, ниже. Пример затрат на изготовление ЛС представлен в таблице 6 «Сравнение стоимости изготовления внутриаптечной заготовки и составных лекарственных средств на примере изготовления 20 упаковок гидрофильного крема бетаметазона валерат 0,1% — 50,0 (Формуляр

DAC/NRF, рецептура NRF 11.37), в ценах 2019 г.» (опубликована на сайте журнала)²⁹.

Блок-схема изготовления ВАЗ представлена на рисунке 2 «Блок-схема изготовления внутриаптечной заготовки» (опубликован на сайте журнала на английском языке)³⁰.

Согласно п. 11 Постановления НАП используемые при изготовлении АФС должны быть надлежащего качества, которое может быть проверено в производственной аптеке либо за ее пределами (п. 3 Постановления НАП). При использовании АФС, качество которых подтверждено сертификатом испытаний сторонней организации, при приемочном контроле осуществляется определение подлинности. Испытаниям также подвергаются все изготовленные в АО тритурации, концентраты, полуфабрикаты, а результаты испытаний оформляются протоколом испытаний (п. 8 Постановления НАП).

В соответствии с п. 11а Постановления НАП АО может передать на аутсорсинг производителям ЛС или другой производственной аптеке деятельность по изготовлению (восстановлению) следующих ЛС: цитостатических ЛС; ЛС для парентерального питания; ЛС, применяемых в других, обоснованных с медицинской точки зрения, случаях особой необходимости; расфасованные ГЛФ; ЛС, которые применяются для лечения угрожающего инфекционного заболевания, распространение которого требует немедленной поставки конкретных ЛС, значительно превышающих обычный уровень потребности. Для этого должен быть заключен письменный договор оказания аутсорсинговых услуг. Руководитель аптеки не может заказывать изготовление ЛС без наличия рецепта врача.

ГЛФ, реализуемые в АО, подлежат выборочному органолептическому контролю качества (п. 12 Постановления НАП). При наличии сомнений в качестве ГЛФ необходимо провести их полный химический контроль.

Протокол испытаний ГЛФ должен содержать название производителя; наименование и ЛФ; номер серии и дату производства; дату и результаты проверки; ФИО и подпись фармацевта, осуществившего контроль качества.

Требования к маркировке РЭЛП установлены п. 14 Постановления НАП.

²⁸ Таблица 5 размещена на сайте журнала (Table 5 is available at the website of the journal). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table5>

²⁹ Таблица 6 размещена на сайте журнала (Table 6 is available at the website of the journal). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table6>

³⁰ Англоязычная версия рисунка 2 размещена на сайте журнала (English translation of Figure 2 is available at the website of the journal). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-fig2>

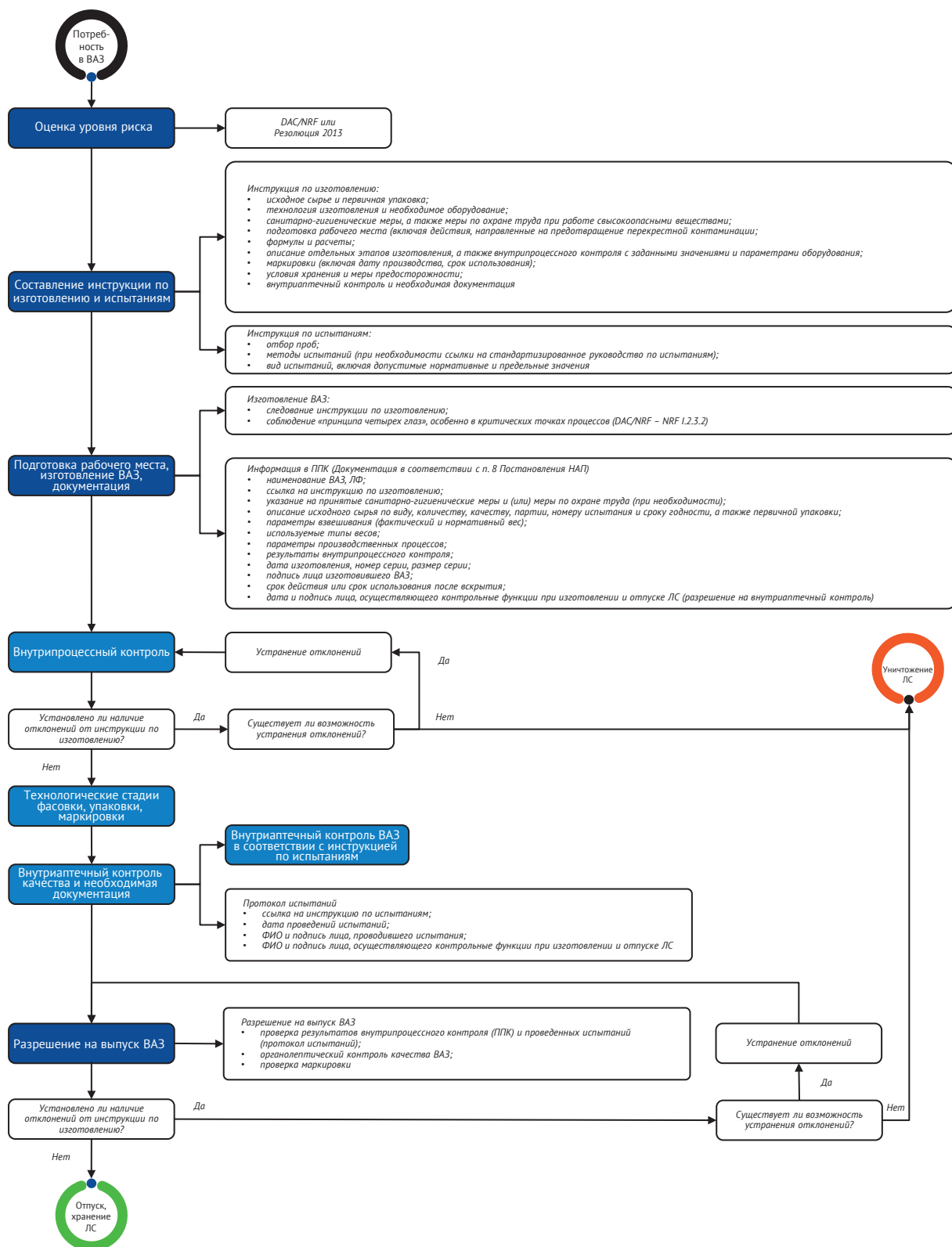


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 2. Блок-схема изготовления внутриаптечной заготовки (БА3). DAC/NRF – национальный формуляр (Deutscher Arzneimittel-Codex / Neues Rezeptur-Formularium); ППК – паспорт письменного контроля; НАП – постановление Минздрава Германии «О работе аптечных организаций» от 09.02.1987; ЛС – лекарственное средство

Fig. 2. Flowchart for compounding stock preparations³⁰

Особо следует отметить, что допускается изготовление парентеральных ЛФ из ГЛФ, при этом в значительной части случаев их изготавливают только из ГЛФ, что также предусмотрено тарифами на разведение (восстановление) ЛС. Если вместо АФС использовалась ГЛФ, достаточно указать только ее состав. В случае если ЛС изготовлен в парентеральной ЛФ, указывается состав ГЛФ, торговое наименование ГЛФ и производителя, номер серии. ВАЗ, предназначенная для отпуска, маркируется как ГЛФ (ст. 10 Закона Германии).

Согласно п. 17 Постановления НАП автоматизированные пункты выдачи ЛС (вендинговые аппараты) разрешено размещать исключительно в АО. Доставка ЛС осуществляется курьерами производственной аптеки без дополнительной лицензии. При осуществлении курьерской доставки ЛС заведующий аптекой должен обеспечить надлежащее соблюдение условий хранения ЛС, кроме того, должна существовать система отслеживания отправок. Доставка должна осуществляться фармацевтическими работниками, если до осуществления доставки в АО не был представлен рецепт на рецептурные ЛС или не была проведена фармацевтическая консультация.

АО имеют право изготавливать ЛС и отпускать ГЛФ для ветеринарного применения. Согласно п. 19 Постановления НАП для осуществления такой деятельности необходимо вести учет реализованных рецептурных ЛС для ветеринарного применения.

В соответствии с п. 24 Постановления НАП при отсутствии АО в отдельном районе Германии может быть открыт пункт приема рецептов для изготовления ЛС. Разрешение на деятельность пункта приема является временным и действует в течение трех лет. Рецепты собирают в контейнер, который печатывается при доставке в АО. На маркировке контейнера указывается название и адрес аптеки, время получения, а также способ получения ЛС пациентом (самовывоз или доставка).

По смыслу п. 26 Постановления НАП к больничным аптекам относят структурные подразделения МО, в обязанности которых входит обеспечение надлежащего снабжения одной или нескольких больниц (межбольничные аптеки) ЛС и медицинскими изделиями. Требования к помещениям больничной аптеки установлены в п. 29 Постановления НАП: площадь производственного помещения не менее 200 м²,

две ассистентских комнаты с вытяжными шкафами, служебное и подсобное помещение, помещения для хранения исходного сырья и ЛС. Согласно п. 33 Постановления НАП все больничные аптеки должны работать круглосуточно.

При осуществлении деятельности по индивидуальной фасовке ЛС в состав СМК должны входить: перечни ГЛФ, разрешенных к фасовке; перечни ГЛФ, запрещенных к фасовке в одном контейнере; инструкция по хранению и маркировке ГЛФ, изъятых из первичной упаковки; требования к калибровке, квалификации, техническому обслуживанию и очистке оборудования для фасовки; описание используемых упаковочных материалов; инструкция по фасовке; инструкция по санитарному режиму; гигиенические требования к персоналу и средствам индивидуальной защиты. Помещение для индивидуальной фасовки должно быть достаточно большого размера для проведения отдельных операций. Доступ к помещению и внесение в него исходных материалов должно осуществляться через промежуточное пространство (шлюз), чтобы обеспечить соответствующее качество воздуха в помещении.

Согласно п. 35 Постановления НАП при изготовлении парентеральных ЛФ СМК производственных аптек должны включать в себя как минимум следующие сведения: об используемом исходном сырье, а также о первичных упаковочных материалах и результатах проверки их качества; о технических и организационных мерах по предотвращению микробной и перекрестной контаминаций; о калибровке, квалификации, обслуживании и очистке оборудования и помещений; о валидации процессов, методов, методик и систем, влияющих на качество ЛС, а также ревалидации; о критически важном оборудовании или устройствах; инструкции по изготовлению, испытаниям, а также о возможной транспортировке ЭЛП; о проведении комплекса санитарно-гигиенических мероприятий.

Изготовление парентеральных ЛФ должно производиться в отдельном помещении, которое не может быть использовано для осуществления других видов деятельности, за исключением изготовления других стерильных ЛФ в соответствии с Фармакопеей. Доступ в асептический блок, а также подача исходного сырья, упаковочных материалов должны осуществляться через воздушный шлюз. Площадь помещения должна обеспечивать выполнение отдельных операций на специальных рабочих местах. Во время изготовления в помещении

могут находиться только сотрудники в защитной одежде, предотвращающей контаминацию ЭЛП. Уровень чистоты помещения определяется в зависимости от порядка изготовления и наличия процесса стерилизации ЛС в соответствии с Правилами надлежащей производственной практики Европейского союза³¹, а вентиляция должна быть обеспечена фильтрами достаточной эффективности. Если ЭЛП не подвергаются стерилизации в конечной упаковке и не изготавливаются с использованием изоляторных технологий, во время приготовления и розлива в локальной зоне для рабочих процессов устанавливается уровень чистоты воздуха по количеству микробов и частиц, соответствующий классу А, и внешняя среда с точки зрения количества частиц и микробов соответствует:

- классу В;
- классу С, если качество ЭЛП подтверждается соответствующей валидацией процесса его изготовления;
- при изготовлении ЛС в рамках изолирующих устройств (фармацевтический изолятор и т.п.) – классу D.

Для фасовки жидких ЛФ необходимо поддерживать чистоту воздуха класса С.

Условия в чистых помещениях должны проверяться путем определения количества твердых частиц и микробов в воздухе, на критических поверхностях и проверки персонала во время изготовления в открытых системах.

Требования по микробиологической чистоте помещений при изготовлении нестерильных ЛС не установлены законодательством Германии.

Фармаконадзором ЛС занимается Комиссия фармацевтов Германии (нем. Arzneimittelkommission der Deutschen Apotheker), представляющая собой независимое национальное учреждение. Комиссия является частью Федерального союза немецких ассоциаций фармацевтов [1].

Для полноценной проверки качества ЛС, изготавливаемых в АО, общественные аптеки могут передать изготовленные ЛС в «Центральную лабораторию немецких фармацевтов» (нем. Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker e.V.), которая проводит полный контроль качества изготовленных ЛС, ежегодно исследует стабильность и, при необходимости, вносит изменения в сроки годности рецептур Формуляра DAC/NRF.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование позволяет выделить следующие значимые особенности организации деятельности по изготовлению ЛС на территории Германии.

1. Изготовление ЛС врачами реализуется в соответствии с принципами «свободы медицинской практики» и до текущего момента осуществляется фактически без какого-либо регуляторного воздействия, что в первую очередь связано с культурными и историческими предпосылками организации системы здравоохранения в рассматриваемой стране.
2. Все аптечные организации являются производственными, что позволяет значительно повысить физическую доступность необходимых ЛП для населения, однако, с другой стороны, такое требование повышает издержки на содержание инфраструктуры, что определенным образом выражается в принципах ценообразования на изготавливаемые ЛП.
3. В нормативных правовых документах закреплена возможность изготовления парентеральных ЛФ из ГЛФ, что, как минимум при использовании последних в качестве растворителя, снижает затраты АО.
4. Правовое поле допускает проведение внутриаптечного контроля качества вне производственной аптеки, изготовившей ЛП, что является дополнительным экономическим преимуществом при наличии у нее нескольких структурных подразделений.
5. Немецкая концепция надлежащих аптечных практик позволяет осуществлять полноценную фармацевтическую разработку ЭЛП с использованием доступных производителям ЛС инструментов валидации, квалификации, верификации.
6. АО вправе самостоятельно, на основе объективных данных или изучения стабильности конкретной рецептуры, устанавливать сроки годности на изготавливаемую номенклатуру ЭЛП.
7. Концепции определения уровней риска позволяют производственным аптекам формировать собственные программы отбора проб, что является ключевым фактором рентабельности деятельности по изготовлению ЛП.

В 2023 г. в Российской Федерации завершилась работа по формированию подзаконного законодательства в отношении принятого Федерального закона № 502-ФЗ «О внесении изменений в статью 56 Федерального закона «Об обращении лекарственных средств». Тем

³¹ EudraLex – Volume 4 – Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines. https://health.ec.europa.eu/medicinal-products/eudralex/eudralex-volume-4_en

не менее разработанные документы и ряд их положений, в том числе концептуальных, сохранили свою преемственность с организационно-фармацевтическими подходами, отраженными в нормативных правовых актах, созданных в Советском Союзе до 1968 г., что в том числе представлено в ранее проведенных исследованиях [2].

25 июня 2024 г. на очередном заседании рабочей группы по производственным аптекам при Комитете Государственной Думы по охране здоровья, а также в рамках рабочего совещания с участием Минздрава России и Фонда «Круг добра», состоявшегося 8 июля 2024 г., была окончательно подтверждена и определена роль производственных аптек для отечественной системы здравоохранения. В частности, сформулирована одна из ключевых задач аптечной производственной инфраструктуры как критически значимого элемента лекарственного обеспечения лиц с тяжелыми жизнеугрожающими и хроническими заболеваниями, в том числе редкими (орфанными) заболеваниями.

В заключение следует отметить, что в случае установленных соответствующих целей, задач, мероприятий и целевых показателей в новых национальных проектах, государственных программах развития здравоохранения, программе государственных гарантий — приоритета системы здравоохранения по развитию в своей структуре современной, высокотехнологичной инфраструктуры по изготовлению ЛП, перехода к принципам персонализированной медицины, внедрения фармакоэкономических моделей, основанных на принципах курсовых назначений при оказании медицинской помощи и лекарственном обеспечении населения, российскому медицинскому, фармацевтическому сообществу и отраслевому законодательству предстоит путь от принятия концепции регулирования до внедрения самых передовых решений в клиническую практику, где ключевым шагом будут выступать поправки в ряд федеральных законов и, прежде всего, в ст. 56 ФЗ-61, в том числе в качестве установленного перехода от Правил изготовления и отпуска ЛП на Правила надлежащей практики изготовления и отпуска ЛП.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Эрдни-Гаряев СЭ, Мамедов ДД, Юрочкин ДС, Зеликова ДД, Голант ЗМ, Фисенко ВС, Наркевич ИА. Нормативное правовое регулирование изготовления лекарственных препаратов аптечными организациями на немецком фармацевтическом рынке. Часть 1. Основные положения законодательства (обзор). *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(1):91–109. Erdni-Garyaev SE, Mamedov DD, Yurochkin DS, Zelikova DD, Golant ZM, Fisenko VS, Narkevich IA. Pharmacy compounding regulation in the German pharmaceutical market. Part 1. Basic regulatory provisions (Review). *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(1):91–109 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-1-91-109>
2. Наркевич ИА, Фисенко ВС, Голант ЗМ, Юрочкин ДС, Мамедов ДД, Эрдни-Гаряев СЭ, Лешкевич АА. Основы формирования единой гармонизированной системы нормативного правового регулирования в области обращения лекарственных препаратов, изготавливаемых аптечными организациями. СПб: Медианапир; 2023. Narkevich IA, Fisenko VS, Golant ZM, Yurochkin DS, Mamedov DD, Erdni-Garyaev SE, Leshkevich AA. *Basis for forming a unified harmonized system of regulation in the field of compounding pharmacies*. St. Petersburg: Mediapapir; 2023 (In Russ.). EDN: PZEVDF
3. Фаррахов АЗ, Соломатина ТВ, Мамедов ДД, Юрочкин ДС, Голант ЗМ, Наркевич ИА. Основы формирования стратегии развития сегмента изготовления и отпуска лекарственных препаратов в Российской Федерации. *Вестник Росздравнадзора*. 2023;(6):6–17. Farrakhov AZ, Solomatina TV, Mamedov DD, Yurochkin DS, Golant ZM, Narkevich IA. Fundamentals of forming a strategy for the development of the segment of manufacturing and dispensing of medicines in the Russian Federation. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2023;(6):6–17 (In Russ.). EDN: NAHOAC
4. Bouwman-Boer Y, Fenton-May V, Le Brun P, eds. *Practical pharmaceuticals. An international guideline for the preparation, care and use of medicinal products*. Cham, Switzerland: Springer; 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-15814-3>

Дополнительная информация. На сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» размещены таблицы 1–6, рис. 1 и 2.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table1>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table2>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table3>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table4>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table5>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table6>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-fig1>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-fig2>

Additional information. Tables 1–6, and Figures 1, 2 are published on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table1>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table2>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table3>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table4>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table5>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-table6>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-fig1>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-590-fig2>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. All the authors have made substantial contributions to the conception of the work, the conduct of the research, and the preparation of the article. All the authors have read and approved the final version prior to its publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Эрдни-Гаряев Сергей Эдуардович / Sergey E. Erdni-Garyaev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6297-9304>

Мамедов Деви Девивич / Devi D. Mamedov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5061-0729>

Юрочкин Дмитрий Сергеевич / Dmitry S. Yurochkin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4609-0155>

Зеликова Дарья Дмитриевна / Daria D. Zelikova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2776-3222>

Голант Захар Михайлович, канд. экон. наук / Zakhar M. Golant, Cand. Sci. (Econ.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0256-6692>

Фисенко Виктор Сергеевич, канд. фарм. наук / Victor S. Fisenko, Cand. Sci. (Pharm.)

Наркевич Игорь Анатольевич, д-р фарм. наук, профессор / Igor A. Narkevich, Dr. Sci. (Pharm.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>

Поступила 07.11.2023

После доработки 10.04.2024

Принята к публикации 10.04.2024

Online first 28.08.2024

Received 7 November 2023

Revised 10 April 2024

Accepted 10 April 2024

Online first 28 August 2024



И.П. Авакьянц ✉ 
Е.А. Герасимец 
Е.С. Петрова 
Д.В. Горячев 

Планирование программы клинических исследований лекарственных препаратов, применяемых для лечения функциональных расстройств желудочно-кишечного тракта (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

✉ Авакьянц Илона Пулатовна; Avakyanc@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Функциональные расстройства желудочно-кишечного тракта (ФР ЖКТ) представляют собой гетерогенную группу расстройств, клинические проявления которых являются неспецифичными и могут встречаться при многих заболеваниях органов пищеварения. В настоящий момент руководство по проведению клинических исследований препаратов для лечения ФР ЖКТ в Российской Федерации отсутствует, в связи с чем поставлена задача его разработки с учетом требований к регистрации лекарственных препаратов в Евразийском экономическом союзе.

ЦЕЛЬ. Систематизация международных подходов к проведению клинических исследований лекарственных средств для терапии ФР ЖКТ с целью последующей разработки руководства по проведению таких исследований в Российской Федерации.

ОБСУЖДЕНИЕ. Стандартом оценки эффективности и безопасности лекарственной терапии является рандомизированное плацебо-контролируемое исследование с применением двойного слепого метода в параллельных группах. Особенности дизайна клинических исследований определяются видом ФР ЖКТ, степенью тяжести его проявления, особенностями определения целевой популяции, конечных точек, наличием (отсутствием) комбинации симптомов, существованием специфических биомаркеров. Планирование клинических исследований, удовлетворяющих принципам доказательной медицины, обеспечивается системным использованием Римских критериев IV пересмотра на разных стадиях разработки и оценки терапевтических стратегий.

ВЫВОДЫ. Комплекс выделенных фундаментальных принципов разработки программы клинических исследований лекарственных препаратов для лечения ФР ЖКТ позволит обеспечить планирование и выполнение исследований в соответствии с международными подходами и этическими стандартами. Разработка рекомендаций по планированию клинических исследований эффективности и безопасности лекарственных препаратов, предназначенных для коррекции ФР ЖКТ, будет способствовать выбору оптимальных методов терапии среди широкого спектра способов лечения.

Ключевые слова: клинические исследования; функциональные расстройства желудочно-кишечного тракта; желудочно-кишечный тракт; Римские критерии IV; синдром раздраженного кишечника; конечные точки

Для цитирования: Авакьянц И.П., Герасимец Е.А., Петрова Е.С., Горячев Д.В. Планирование программы клинических исследований лекарственных препаратов, применяемых для лечения функциональных расстройств желудочно-кишечного тракта (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(1):82–91. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-82-91>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 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.

Ilona P. Avakiants 
Evgenii A. Gerasimets 
Elena S. Petrova 
Dmitriy V. Goryachev 

Planning a Clinical Development Programme for Medicinal Products for Functional Gastrointestinal Disorders

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

✉ Ilona P. Avakiants; Avakiants@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Functional gastrointestinal disorders (FGIDs) are a heterogeneous group of disorders characterised by non-specific clinical signs that may occur in various diseases of the digestive system. Currently, there are no guidelines for conducting clinical trials of medicinal products for FGIDs in the Russian Federation. It is, therefore, essential to develop such guidelines taking into account the current requirements for marketing authorisation in the Eurasian Economic Union (EAEU).

AIM. This study aimed to provide a systematic overview of international approaches to clinical trials of medicinal products for FGIDs, which will inform further development of a guideline for conducting these clinical trials in the Russian Federation.

DISCUSSION. The gold standard for assessing the safety and efficacy of pharmacotherapy is a randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled trial. The design of a clinical trial depends on a number of factors, including the type and severity of the FGID, the demographics of the target population, the selected endpoints, and the presence (or absence) of specific symptom combinations and biomarkers. To plan a clinical trial that meets the principles of evidence-based medicine, the Rome IV criteria should be used consistently at all stages of treatment strategy development and assessment.

CONCLUSIONS. Following the described fundamental principles for the development of clinical trial programmes for medicinal products for FGIDs will ensure that clinical trials are planned and conducted in full compliance with international approaches and ethical standards. The development of a Russian guideline for planning clinical trials of the safety and efficacy of medicinal products for FGID management will facilitate selecting the optimum treatment method from a wide spectrum of available treatments.

Keywords: clinical trials; functional gastrointestinal disorders; gastrointestinal; Rome IV criteria; irritable bowel syndrome; endpoints

For citation: Avakiants I.P., Gerasimets E.A., Petrova E.S., Goryachev D.V. Planning a clinical development programme for medicinal products for functional gastrointestinal disorders. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(1):82–91. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-82-91>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022300127-0).

Disclosure. Dmitriy 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

Функциональные расстройства желудочно-кишечного тракта (ФР ЖКТ) представляют собой гетерогенную группу расстройств, этиология которых обусловлена нарушением взаимодействия центральной и периферической нервной системы и, вероятно, не связана с явными органическими изменениями. Современные теории патогенеза ФР ЖКТ предполагают, что их симптоматика обусловлена комплексом причинно-следственных связей. Ключевым механизмом является нарушение нейрогуморальной регуляции ЖКТ со стороны центральной нервной системы. В развитии данных расстройств также играют роль микробный дисбиоз, нарушение иммунной функции слизистых оболочек кишечника, висцеральная гиперчувствительность, а также дисрегуляция модулирующего влияния центральной нервной системы на сенсорную и моторную функции кишечника. У каждого пациента вклад этих факторов в развитие заболевания индивидуален, что приводит к высокой степени вариабельности клинической картины ФР ЖКТ. Постоянный прогресс в понимании патогенеза ФР ЖКТ предполагает возможность разработки более эффективных методов диагностики и лечения этих распространенных и значительно снижающих качество жизни состояний [1–4].

Диагностика ФР ЖКТ, проводимая методом исключения, основывается преимущественно на клинической картине, которая характеризуется хроническими симптомами при отсутствии выявляемых структурных или биохимических аномалий, что создает определенные трудности в верификации диагноза. В настоящее время для диагностики ФР ЖКТ применяются Римские критерии IV пересмотра (далее – Римские критерии IV), классифицирующие данные расстройства на основе симптоматики, связанной с поражением различных отделов ЖКТ [1–5].

В Международной классификации болезней 10 пересмотра (МКБ-10) специальный код, определяющий ФР ЖКТ, отсутствует, поэтому применяются коды в зависимости от области поражения ЖКТ. Современная классификация ФР ЖКТ, согласно Римским критериям IV, включает следующие группы нарушений.

- А. Расстройства функции пищевода / эзофагальные расстройства.
- В. Гастродуоденальные расстройства.
- С. Расстройства функции кишечника / кишечные расстройства.
- Д. Расстройства центрального генеза, проявляющиеся абдоминальной болью / центрально-

опосредованные расстройства гастроинтестинальной боли.

Е. Расстройства функции желчного пузыря и сфинктера Одди.

Ф. Аноректальные расстройства.

Г. Детские функциональные желудочно-кишечные расстройства у новорожденных.

Н. Функциональные заболевания желудочно-кишечного тракта у детей и подростков.

Согласно данным, полученным в 2020 г., распространенность функциональной дисфагии составила 1,2–3,2% [6], функциональной диспепсии – 20,8% [7]. Среди функциональных кишечных расстройств с наибольшей частотой наблюдался функциональный запор (6,6–11,7%), функциональная диарея встречалась значительно реже (1,2–4,7%). Распространенность синдрома раздраженного кишечника (СРК) составила (1,5–4,1%) с более высокими показателями среди женщин [8]. Среди аноректальных расстройств доминировала прокталгия (1,5–5,6%) [6]. Исследования, проведенные Всемирной организацией здравоохранения, выявили высокую частоту перекрестных расстройств среди функциональных заболеваний органов пищеварения. Так, у 42–87% пациентов с СРК диагностируется функциональная диспепсия, а у 49% пациентов с СРК – нарушения моторики билиарного тракта [9].

Таким образом, ФР ЖКТ имеют высокую распространенность и частоту перекреста с тенденцией роста заболеваемости населения в течение последних лет [5], что является предпосылкой разработки эффективных лекарственных средств для лечения этих состояний.

В настоящее время в Российской Федерации не завершено формирование требований к планированию и проведению клинических исследований (КИ) лекарственных препаратов для лечения функциональных расстройств ЖКТ.

Цель работы – систематизация международных подходов к проведению клинических исследований лекарственных средств для терапии функциональных расстройств желудочно-кишечного тракта с целью последующей разработки руководства по проведению таких исследований в Российской Федерации.

В настоящей статье проанализированы некоторые аспекты планирования и проведения КИ лекарственных средств, применяемых при ФР ЖКТ, описанные в зарубежных и отечественных научных источниках. Работа выполнена методом информационно-аналитического поиска, проведен анализ статей и монографий, опубликованных

в период 2009–2023 гг. и размещенных в библиографических базах РИНЦ, Scopus, PubMed, Wiley. Ключевые слова для поиска: функциональные расстройства желудочно-кишечного тракта; Римские критерии IV; синдром раздраженного кишечника. Анализировали также российские и зарубежные клинические рекомендации по терапии ФР ЖКТ.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Цель, задачи и гипотеза клинических исследований. Современная методология КИ лекарственных препаратов для лечения ФР ЖКТ определяется Римскими критериями IV [1, 2, 5, 6] и, как и в случаях других лекарственных препаратов, требует строгого соблюдения принципов доказательной медицины и этических стандартов.

Основной задачей планирования КИ является формирование гипотезы о предполагаемом эффекте изучаемого лечения на основе механизма его действия. Очевидно, что ни один терапевтический подход не сможет полностью устранить все симптомы заболевания. В большинстве интервенционных исследований ФР ЖКТ оценивают влияние терапии на облегчение или уменьшение тяжести симптомов, улучшение самочувствия, повышение качества жизни и эффективности использования ресурсов здравоохранения. Главной целью исследования лекарственных препаратов для лечения ФР ЖКТ является определение уровня воздействия лечения на симптомы [10]. Первичные конечные точки исследований должны определять эффективность предлагаемой терапии по отношению к наиболее выраженным клиническим проявлениям, например в случае СРК в качестве конечных точек были предложены боль в животе и нарушения акта дефекации [9].

Особенностью планирования гипотез в случае ФР ЖКТ является то, что исследования эквивалентности или не меньшей эффективности препарата при высокой субъективности оцениваемых показателей и высоком потенциале применения плацебо не могут рассматриваться в качестве основных. Целью исследований лекарственных средств, применяемых при ФР ЖКТ, должно быть доказательство превосходства над стандартной терапией или плацебо [11, 12].

Определение популяции и выборки пациентов. При выявлении целевой популяции ФР ЖКТ

учитывается выраженность клинических проявлений и характерных для исследуемого заболевания симптомов. Целевая популяция должна включать как можно более широкий спектр пациентов, определяемых Римскими критериями IV. На ранних стадиях разработки лекарственного средства в целях изучения безопасности и эффективности препаратов для всех групп населения КИ проводятся при условии репрезентативного гендерного и этнического представительства пациентов¹.

При формировании целевых популяций и для дальнейшей фиксации результатов КИ могут использоваться биомаркеры. Следует отметить, что в настоящее время известно немного биомаркеров, обладающих чувствительностью и специфичностью при верификации и оценке ФР ЖКТ, и они не могут быть отнесены к сурrogатным конечным точкам, однако их можно использовать для стратификации пациентов. В качестве примера можно привести такие показатели, как общее количество иммунных и тучных клеток; содержание интерферона-гамма в слизистой оболочке толстой кишки; уровни экспрессии Toll-подобного рецептора 4 (Toll-like receptor 4, TLR-4); редкие генетические мутации (например, мутация в гене *GUCY2C*, кодирующем рецептор гуанилатциклазы C в энтероцитах), связанные с функциональной диареей; изменения в содержании белков, формирующих клеточные контакты между эпителиоцитами, и др. [2, 13, 14].

Отбор пациентов для участия в КИ проводится на основе четких требований к определению состояния, которое можно оценить в клинических условиях при дальнейшем применении препаратов. Классификация ФР ЖКТ с помощью Римских критериев IV является на настоящий момент наиболее полной и хорошо зарекомендовавшей себя диагностической системой, обеспечивающей необходимый уровень стандартизации участников, а также позволяющей сопоставить исследования между собой [1, 2, 15, 16]. Критерии включения пациентов в исследование могут различаться при различных состояниях. Так, для исследований СРК, сопровождающегося запором или диареей, рекомендуются² разные критерии включения, а для пациентов с СРК, сопровождающимся как запором, так и диареей, требования к включению отсутствуют [8].

¹ Guidance for industry: Irritable bowel syndrome clinical evaluation of drugs for treatment. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2012.

² CPMP/EWP/785/97 Rev. 1. Guideline on the evaluation of medicinal products for the treatment of irritable bowel syndrome. EMA; 2014.

При определении критериев не включения пациентов следует учитывать психологические, генетические, биологические, социокультурные факторы. Влияние сопутствующих психологических факторов как предикторов негативной реакции на лечение ФР ЖКТ требует отдельного изучения [5, 17]. Так, например, психологические факторы существенно влияют на эффекты плацебо и ноцебо, поэтому при планировании КИ лекарственных средств, применяемых при ФР ЖКТ, целесообразно рассмотреть критерии не включения, которые могли бы ограничить такую чувствительность участников исследования и искажение оценки эффективности препарата.

При составлении выборки рекомендуется оценивать возможное сочетание нескольких видов ФР ЖКТ (синдромом перекреста), а также сопутствующие соматические и психические расстройства, поскольку эти факторы осложняют оценку эффективности препарата [1, 4, 18].

В протоколе КИ должны быть определены принципы расчета размера выборки [19], в том числе указан минимальный размер эффекта, на выявление которого направлено исследование, величина ошибки I рода, статистическая мощность, позволяющая выявить минимальную величину эффекта, или величина ошибки II рода, а при оценке результатов — стандартное отклонение. Обратная терапевтическому эффекту величина позволяет рассчитать количество пациентов, необходимых для исследования, в результате которого можно выявить пациента с положительным ответом на лечение [10]. При оценке соответствующего размера выборки следует учитывать возможность выбывания пациентов и сообщать о количестве и сроках выбывания таких пациентов из исследования [19].

Дизайн клинических исследований. Маскировка участников, исследователей и экспертов при назначении терапии является ключевой особенностью успешного контролируемого исследования [14]. Основная цель ослепления состоит в обеспечении максимальной достоверности измерения первичного результата и предотвращении идентификации препаратов до тех пор, пока не будет исключена возможность возникновения систематических ошибок.

Для улучшения достоверности исследований препаратов у пациентов с ФР ЖКТ необходимо использование независимой экспертизы или стандартизированных опросников, заполняемых интервьюером или самостоятельно как пациентом, так и исследователем [20].

При планировании КИ рекомендуется использовать стратифицированную рандомизацию (например, мужчины по сравнению с женщинами, СРК с запором по сравнению с СРК с диареей).

Оптимальным дизайном проведения КИ новых методов лечения ФР ЖКТ является двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование в параллельных группах. Варианты дизайна при исследовании ФР ЖКТ могут состоять в исследовании групп, получающих разные дозы лекарственного препарата, один или более препаратов сравнения; группы с начальным периодом отсутствия терапии и периодом последующего наблюдения после завершения лечения.

Поскольку не существует универсальной терапии ФР ЖКТ, стандартным дизайном КИ препаратов при этом состоянии является исследование нового препарата в сравнении с плацебо для доказательства превосходства над ним. Исследование эквивалентности или не меньшей эффективности проводятся в случае, если новый метод лечения ФР ЖКТ более удобен или экономически выгоден [11, 12].

Изучение плацебо-эффекта вместе с применением ослепления помогает исследователям уменьшить вероятность систематической ошибки при оценке нежелательных реакций. Эффект плацебо хорошо описан в исследованиях ФР ЖКТ, особенно при функциональной диспепсии и СРК, его частота варьирует от 6 до 72% и от 0 до 84% соответственно. Такой эффект отчасти объясняется психологическим воздействием в результате оказываемого пациентам, включенным в исследование, внимания (подробное консультирование, разъяснение механизмов заболевания, мониторинг состояния, свободный доступ к координаторам исследования и лечащим врачам), что в совокупности может оказывать выраженный терапевтический эффект [2, 20–22]. Метаанализ продемонстрировал, что ответ на плацебо регистрируется чаще, когда в качестве показателя оценивается «улучшение симптомов СРК» по сравнению с показателем «уменьшение боли в животе» [20, 21]. Для нивелирования плацебо-эффекта может быть применен метод «вводного периода плацебо», в течение которого все пациенты получали плацебо, и их ответы оценивались с использованием стандартных критериев ответа. В дальнейшем пациенты с ФР ЖКТ, состояние которых «значительно улучшилось» в данный период, исключаются из исследования [22].

При лечении ФР ЖКТ может быть использован перекрестный дизайн КИ, представляющий собой исследование с целью сравнения методов лечения. В ходе такого исследования участники получают два вида лечения в течение определенного периода времени, обычно разделенных периодом «отмывки», в рандомизированном порядке [23]. Перекрестный дизайн может повысить чувствительность КИ препаратов, назначаемых для терапии ФР ЖКТ, и определить оптимальный размер выборки добровольцев для достижения желаемой статистической мощности. Таким образом, перекрестные исследования при терапии ФР ЖКТ наиболее применимы в случаях, когда конечные точки измеряются объективно, период исследования относительно короток, а эффект терапии ожидается непродолжительным.

Для пациентов с тяжелыми симптомами ФР ЖКТ желательно проведение оценки комбинированной терапии. Для каждого препарата требуется формирование соответствующей контрольной группы [10].

Дизайн отмены представляет собой особый тип исследования, в котором все пациенты с ФР ЖКТ получают активное лечение и в заранее определенный период времени классифицируются как отвечающие или не отвечающие на терапию. Последние затем исключаются из КИ, а ответившим на лечение дальнейшее лечение назначают случайным образом активным препаратом или плацебо. Основным недостатком данного дизайна является потенциальный остаточный эффект от активного лечения.

В рекомендациях Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) по КИ препаратов для лечения СРК³ отдельно выделяют исследования, направленные на установление краткосрочной эффективности, для которых приемлемая продолжительность лечения 4 нед. или более, и исследования, направленные на установление долгосрочной эффективности, для которых рекомендуется продолжительность лечения не менее 6 мес. Для определения продолжительности лечения необходимо рассмотреть вопрос о расширенном наблюдении за пациентом с ФР ЖКТ, учесть периодичность появления симптомов, механизм воздействия препарата. Известен ряд исследований, проводившихся в параллельном дизайне с целью установления долгосрочной эффективности лечения

продолжительностью 6 мес. у пациентов с ФР ЖКТ [24, 25].

КИ могут проводиться для оценки эффективности не только препаратов терапии, но и иных средств, например пробиотиков. КИ пробиотиков требуют соблюдения тех же критериев, дизайна и конечных точек, что и классические исследования фармакологической эффективности [3, 26]. Минимальные требования к исследованиям по применению пробиотиков должны включать оценку присутствия микроорганизмов в кале или в просвете кишечника у пациентов репрезентативной выборки.

Интерпретация результатов оценки эффективности терапии. При оценке исходов из-за высокой субъективности симптоматики желудочной и кишечной диспепсии необходимо учитывать мнение пациента. Результаты (исходы), сообщенные пациентом (patient-reported outcome, PRO), используются для описания субъективного статуса в структурированном формате в стандартизированной индивидуальной регистрационной карте [27].

Оценка и изменение отдельных симптомов ФР ЖКТ осуществляются по набору основных признаков, в том числе частоты, тяжести, выраженности и прогнозируемости [28]. Проявление специфических симптомов ФР ЖКТ, в свою очередь, может влиять на осуществление физических, социальных и эмоциональных функций, то есть на качество жизни, связанное со здоровьем (health-related quality of life, HRQOL) [29].

Следует обратить внимание, что все иноязычные опросники, используемые в исследованиях, должны быть переведены на русский язык и валидированы для применения среди русскоязычной категории пациентов. Уровень болевых симптомов, связанных с ФР ЖКТ, оценивается с использованием общего опросника качества жизни EQ-5D [10]. Стандартным опросником для оценки эффективности лечения диспепсии является адаптированная из ранее широко применяемой 5-балльной шкалы глобальная шкала общих симптомов (Glasgow Outcome Scale, GOS) [30]. Тяжесть симптомов со стороны верхних отделов ЖКТ определяют с использованием 7-балльной шкалы Лайкерта. Подробное описание опросников, применяемых в исследованиях, представлено в работе [31].

Римские критерии исторически объединяли «боль» и «дискомфорт» в одни и те же

³ CPMP/EWP/785/97 Rev. 1. Guideline on the evaluation of medicinal products for the treatment of irritable bowel syndrome. EMA; 2014.

симптомокомплексы. Боль в животе является определяющей характеристикой многих ФР ЖКТ и важным фактором, влияющим на тяжесть симптомов, снижение качества жизни и использование ресурсов здравоохранения. Боль при ФР ЖКТ обычно оценивают по степени тяжести с использованием числовой рейтинговой шкалы. Значительно меньше выявляют другие характеристики боли, в том числе частоту, постоянство, давность, продолжительность, выраженность, прогнозируемость, связь с нарушением моторики, с приемом пищи, перистальтикой кишечника, дефекацией и другими физиологическими процессами. Для измерения боли в животе при СРК рекомендовано использование стандартной 11-балльной числовой оценочной шкалы NRS (numeric rating scale for pain)⁴ и оценка дискомфорта и боли отдельно, указывая тип симптома [16].

В некоторых рандомизированных контролируемых исследованиях ФР ЖКТ использовались простые в интерпретации бинарные конечные точки, которые предполагают бивариантный ответ «наличие/отсутствие улучшений состояния». Мнения о корректности использования таких показателей расходятся: Римские критерии IV рекомендуют использование бинарных конечных точек в качестве стандарта для КИ препаратов для лечения СРК и ФР ЖКТ [31], в то время как Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) с осторожностью относится к такой оценке, основываясь на опасениях, связанных с потенциальной зависимостью клинического эффекта от исходной степени тяжести, что приводит к затруднению выявления минимально значимых клинических различий (MCID) [32]. Несмотря на это, анализ данных 12 проведенных КИ с участием 10 тыс. пациентов продемонстрировал валидность бинарного ответа по широкому спектру переменных и возможность оценить с его помощью MCID основных симптомов при заболеваниях ЖКТ [33].

Важной характеристикой является частота и форма стула. Эти показатели являются частью конечных точек, рекомендованных FDA и ЕМА в КИ лечения СРК. В случае нарушения акта дефекации в исследованиях СРК с преобладанием запора рекомендуется фиксировать частоту стула, с преобладанием диареи — форму стула. Частота стула может фиксироваться пациентом

самостоятельно с использованием следующих оценочных показателей опорожнения: спонтанное опорожнение кишечника (без необходимости ручных манипуляций или слабительных средств), полное спонтанное опорожнение кишечника (полная эвакуация без остаточного ощущения задержки стула) [8].

В качестве валидированного показателя формы стула, который также коррелирует со временем прохождения содержимого через кишечник, используется Бристольская шкала формы стула (Bristol Stool Form Scale, BSFS)⁵. BSFS имеет достаточную достоверность и повышает надежность сообщений пациентов о консистенции стула. Недостатками этой шкалы являются сложность оценки множественных типов формы стула при одном и том же акте дефекации и сложность определения начала и конца дефекации⁶.

Оценку эффективности препаратов терапии ФР ЖКТ усложняют высокая частота реакции на плацебо; наличие симптомов переменного характера, различающихся степенью тяжести; потенциальная необходимость мультифокусной терапии; искажение результатов лечения на фоне препаратов, принимаемых для лечения сопутствующих заболеваний; наличие вреда для здоровья при лечении не угрожающих жизни заболеваний; отсутствие биомаркеров как для диагностики рассматриваемого расстройства, так и для оценки ответа на лечение; отсутствие приемлемых конечных точек для многих ФР ЖКТ [2, 14, 20].

При оценке эффекта лечения также высоки риски систематической ошибки, которая может возникнуть на любой стадии КИ: от планирования до публикации результатов. С учетом анализа практики проведения исследований в других странах к наиболее вероятным систематическим ошибкам могут быть отнесены: субъективизм исследователя, выраженный в решениях о приемлемости методов; изменения в ожидаемой продолжительности лечения пациента; изменения в составе участников; неспецифические эффекты (отношения врача и пациента); регрессия к среднему значению (пациентов обычно включают в набор при наличии максимального числа и выраженности симптомов); предвзятость публикации (авторы с большей вероятностью представляют исследования с положительными результатами, а журналы с большей вероятностью публикуют их).

⁴ CPMP/EWP/785/97 Rev. 1. Guideline on the evaluation of medicinal products for the treatment of irritable bowel syndrome. ЕМА; 2014.

⁵ Синдром раздраженного кишечника. Клинические рекомендации. Минздрав России; 2021.

⁶ Там же.

Для интерпретации результатов КИ препаратов для терапии ФР ЖКТ решающее значение имеет соблюдение режима лечения пациентами. В большинстве исследований в качестве приемлемого порога приверженности лечению, позволяющего достоверно оценить эффективность лечебных мероприятий, принимается уровень 80% [10]. Оценка приверженности лечению может быть выявлена независимо на основе измерения метаболитов лекарственного препарата, подсчета принятых препаратов, мониторинга визитов, электронного мониторинга, мониторинга рецептов, использования систем дистанционного контроля, анкетирования с помощью опросников или мнения врача.

Стратегии сбора данных. Для оценки промежуточных результатов лечения CPK FDA и EMA рекомендуют использовать ежедневные дневники, что позволяет минимизировать систематические ошибки и избежать влияния субъективного мнения исследователя. Оценка симптомов может осуществляться в установленное время (например, перед сном) или при проявлении симптомов. Указанная рекомендация может быть распространена и на иные ФР ЖКТ.

Для обеспечения своевременного сбора данных FDA предлагает использовать интерактивный голосовой автоответчик или персональный цифровой помощник. Получению более точной информации о фактическом появлении симптомов и их динамике может способствовать регистрация возникновения симптомов в режиме реального времени с использованием электронных приложений на портативных устройствах [34]. Однако большее значение имеет соблюдение пациентами режима лечения, а преимущества электронных приложений по сравнению с бумажными дневниками требуют доказательств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Действующая практика планирования, выполнения и проведения клинических исследований лекарственных препаратов, разработанных

для лечения ФР ЖКТ, позволяет выделить ряд фундаментальных подходов к проведению КИ, обеспечивающих соблюдение принципов доказательной медицины.

1. Планирование и выполнение клинических исследований в строгом соответствии с общими требованиями к проведению таких исследований и этическими стандартами.
2. Стандартизация протоколов исследований, обеспечивающая сопоставимость данных и объективность оценки результатов. Главным инструментом определения диагностических стандартов ФР ЖКТ являются Римские критерии IV.
3. Системное применение Римских критериев IV при разработке и оценке терапевтических стратегий, включая выбор целевых симптомов, популяций, критериев включения и исключения участников исследования.
4. Проведение клинических исследований с использованием двойного слепого метода.
5. Целью исследований лекарственных средств должно быть доказательство превосходства исследуемого препарата над стандартной терапией или плацебо.
6. Использование для оценки эффективности лекарственных средств следующих критериев:
 - улучшение симптомов, устанавливаемое с помощью валидированных шкал, подобных шкале оценки симптомов Римских критериев IV;
 - определение качества жизни на основе использования стандартизированных опросников.

Комплекс выделенных фундаментальных принципов разработки программы клинических исследований лекарственных препаратов для лечения ФР ЖКТ позволит обеспечить планирование и выполнение исследований с учетом современных международных подходов, этических стандартов и получить достоверные и научно обоснованные данные об эффективности и безопасности лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Лазебник ЛБ, Голованова ЕВ, Волель БА, Корочанская НВ, Лялюкова ЕА, Мокшина МВ и др. Функциональные заболевания органов пищеварения. Синдромы перекреста. Клинические рекомендации Российского научного медицинского общества терапевтов и Научного общества гастроэнтерологов России. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021;(8):5–117. Lazebnik LB, Golovanova EV, Volel BA, Korochanskaya NV, Lyalyukova EA, Mokshina MV, et al. Functional gastrointestinal disorders. Overlap syndrome. Clinical guidelines of the Russian Scientific Medical Society of Internal Medicine and Gastroenterological Scientific Society of Russia. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021;(8):5–117 (In Russ.). <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-192-8-5-117>
2. Сереброва СЮ, Прокофьев АБ, Журавлева МВ, Еременко НН. Римские критерии IV функциональных заболеваний желудочно-кишечного тракта в оценке взаимозаменяемости лекарственных препаратов: взгляд врача — клинического фармаколога. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2017;7(4):221–7. Serebrova SYu, Prokofiev AB, Zhuravleva MV, Eremenko NN. Rome IV criteria of functional gastrointestinal diseases in evaluation of drugs interchangeability: Through the eyes of a clinical

- pharmacologist. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017;7(4):221–7 (In Russ.). EDN: [ZWDDTH](#)
3. Минушкин ОН. Новые представления о функциональных расстройствах кишечника и место современных пробиотиков в их лечении. *Медицинский Совет*. 2018;(21):126–31. Minushkin ON. New ideas about functional intestinal disorders and the place of modern probiotics in their treatment. *Medical Council*. 2018;(21):126–31 (In Russ.). <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2018-21-126-131>
 4. Ивашкин ВТ, Маев ИВ, Трухманов АС, Шептулин АА, Лапина ТЛ, Симаненков ВИ, Соколов КА. Воспаление, нарушение моторной функции и висцеральная гиперчувствительность: основные механизмы функциональных расстройств желудочно-кишечного тракта (обзор литературы и резолюция Совета Экспертов). *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2022;32(1):7–14. Ivashkin VT, Maev IV, Trukhmanov AS, Sheptulin AA, Lapina TL, Simanenkov VI, Sokolov KA. Inflammation, impaired motor function and visceral hypersensitivity: the main mechanisms of functional disorders of the gastrointestinal tract (materials of the Expert Council and literature review). *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2022;32(1):7–14 (In Russ.). <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2022-32-1-7-14>
 5. Голованова ЕВ. Возможности коррекции функциональных расстройств желудочно-кишечного тракта у пациентов с тревожными расстройствами. *PMJ*. 2020;28(6):45–8. Golovanova EV. Treatment modalities for functional gastrointestinal disorders in patients with anxiety disorders. *RMJ*. 2020;28(6):45–8 (In Russ.). EDN: [WBQSV](#)
 6. Sperber AD, Bangdiwala SI, Drossman DA, Ghoshal UC, Simren M, Tack J, et al. Worldwide prevalence and burden of functional gastrointestinal disorders, results of Rome Foundation global study. *Gastroenterology*. 2021;160(1):99–114.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.014>
 7. Ford AC, Marwaha A, Sood R, Moayyedi P. Global prevalence of, and risk factors for, uninvestigated dyspepsia: A meta-analysis. *Gut*. 2015;64(7):1049–57. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307843>
 8. Герасимец ЕА, Румянцев НА, Ильин РС, Горячев ДВ. Планирование клинических исследований препаратов для лечения синдрома раздраженного кишечника: анализ Рекомендаций Европейского агентства по лекарственным средствам. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(4):463–73. Gerasimets EA, Romyantsev NA, Ilin RS, Goryachev DV. Planning a clinical development programme for medicinal products for irritable bowel syndrome: An analysis of the European Medicines Agency's recommendations. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(4):463–73 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-4-463-473>
 9. Голованова ЕВ. Функциональные гастроинтестинальные расстройства: подходы к коррекции психосоматических нарушений. *PMJ*. 2019;27(5):24–9. Golovanova EV. Functional gastrointestinal disturbances: Ways to psychosomatic correction. *RMJ*. 2019;27(5):24–9 (In Russ.). EDN: [DDNPIU](#)
 10. Irvine EJ, Tack J, Crowell MD, Gwee KA, Ke M, Schmulson MJ, et al. Design of treatment trials for functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology*. 2016;150(6):1469–80.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.010>
 11. Enck P, Klosterhalfen S. Placebo responses and placebo effects in functional gastrointestinal disorders. *Front Psychiatry*. 2020;11:797. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00797>
 12. Ford AC, Quigley EM, Lacy BE, Lembo AJ, Saito YA, Schiller LR, et al. Effect of antidepressants and psychological therapies, including hypnotherapy, in irritable bowel syndrome: Systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(9):1350–65. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.148>
 13. Camilleri M. Peripheral mechanisms in irritable bowel syndrome. *N Engl J Med*. 2013;368(6):578–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1214185>
 14. Spiller RC. Potential biomarkers. *Gastroenterol Clin North Am*. 2011;40(1):121–39. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2011.01.001>
 15. Duffy M, Boggiano VL, Ganesh R, Mueller M. Functional gastrointestinal disorders. *Prim Care*. 2023;50(3):429–46. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2023.03.006>
 16. Black CJ, Drossman DA, Talley NJ, Ruddy J, Ford AC. Functional gastrointestinal disorders: Advances in understanding and management. *Lancet*. 2020;396(10263):1664–74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32115-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32115-2)
 17. Горячева ЕЕ, Алексеева ОП, Касимова ЛН. Приверженность лечению у пациентов с гастроэнтерологической патологией: роль отдельных факторов. *Казанский медицинский журнал*. 2016;97(1):31–7. Goryacheva EE, Alekseeva OP, Kasimova LN. Treatment compliance in patients with gastrointestinal diseases: Role of certain factors. *Kazan Medical Journal*. 2016;97(1):31–7 (In Russ.). <https://doi.org/10.17750/KMJ2016-31>
 18. Лычкова АЕ, Самсонов АА, Андреев ДН, Кузнецова ЕИ. Особенности моторной функции желудочно-кишечного тракта при перекресте функциональной патологии. *Consilium Medicum*. 2023;25(5):333–5. Lychkova AE, Samsonov AA, Andreev DN, Kuznetsova EI. Features of the motor function of the gastrointestinal tract at the cross-functional pathology. *Consilium Medicum*. 2023;25(5):333–5 (In Russ.). <https://doi.org/10.26442/20751753.2023.5.202210>
 19. Шредер ОВ, Горячев ДВ, Меркулов ВА. Основные принципы расчета необходимой численности участников клинических исследований. Часть 1. Общие подходы (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):338–50. Shreder OV, Goryachev DV, Merkulov VA. 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):338–50 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-338-350>
 20. Jamshidian F, Hubbard AE, Jewell NP. Accounting for perception, placebo and unmasking effects in estimating treatment effects in randomised clinical trials. *Stat Methods Med Res*. 2014;23(3):293–307. <https://doi.org/doi/10.1177/0962280211413449>
 21. Huang X, Oshima T, Tomita T, Fukui H, Miwa H. Meta-analysis: Placebo response and its determinants in functional dyspepsia. *Am J Gastroenterol*. 2021;116(11):2184–96. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001397>
 22. Kim SE, Kubomoto S, Chua K, Amichai MM, Pimentel M. “Pre-cebo”: An unrecognized issue in the interpretation of adequate relief during irritable bowel syndrome drug trials. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46(8):686–90. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31825828a7>
 23. Caballero-Mateos AM, López-Hidalgo JL, Torres-Parejo Ú, Hernández-González JM, Quintero-Fuentes MD, Caballero-Plasencia AM, Redondo-Cerezo E. Risk factors for functional dyspepsia, erosive and non-erosive gastroesophageal reflux disease: A cross-sectional study. *Gastroenterol Hepatol*. 2023;46(7):542–52. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2022.12.005>
 24. Chey WD, Lembo AJ, Lavins BJ, Shiff SJ, Kurtz CB, Currie MG, et al. Linaclotide for irritable bowel syndrome with constipation: A 26-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate efficacy and safety. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(11):1702–12. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.254>
 25. Ducrotte P, Grimaud JC, Dapoigny M, Personnic S, O'Mahony V, Andro-Delestrain MC. On-demand treatment with

- alverine citrate/simeticone compared with standard treatments for irritable bowel syndrome: Results of a randomised pragmatic study. *Int J Clin Pract.* 2014;68(2):245–54. <https://doi.org/10.1111/ijcp.12333>
26. Haller D, Antoine JM, Bengmark S, Enck P, Rijkers GT, Lenoir-Wijnkoop I. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: Probiotics in chronic inflammatory bowel disease and the functional disorder irritable bowel syndrome. *J Nutr.* 2010;140(3):690S–7S. <https://doi.org/10.3945/jn.109.113746>
 27. Gracie DJ, Ford AC. Using patient-reported outcome measures in gastroenterology: PROMISed land or road to nowhere? *Am J Gastroenterol.* 2016;111(11):1557–8. <https://doi.org/10.1038/ajg.2016.415>
 28. Spiegel BM, Bolus R, Agarwal N, Sayuk G, Harris LA, Lucak S, et al. Measuring symptoms in the irritable bowel syndrome: Development of a framework for clinical trials. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;32(10):1275–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04464.x>
 29. Jang SH, Choi SC, Kim YS, Ryu HS, Lee SY, Bahk WM. Psychological characteristics and quality of life of patients with upper and lower functional gastrointestinal disorders. *J Clin Med.* 2022;12(1):124. <https://doi.org/10.3390/jcm12010124>
 30. Лазебник ЛБ, Лялюкова ЕА, Алексеенко СА, Самсонов АА, Сереброва СЮ, Цуканов ВВ, Карева ЕН. Обследование пациентов с синдромом диспепсии и изжоги в амбулаторно-поликлинической практике: нужен ли новый опросник терапевту, врачу общей практики. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2018;150(2):167–73. Lazebnik LB, Lyalyukova EA, Alexeenko SA, Samsonov AA, Serebrova SYu, Tsukanov VV, Kareva EN. Diagnostic evaluation of patient with dyspepsia syndrome and heartburn by GP and primary care physician: Need of a new & simple questionnaire. *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 2018;150(2):167–73 (In Russ.). EDN: XUXAJN
 31. Ang D, Talley NJ, Simren M, Janssen P, Boeckxstaens G, Tack J. Review article: Endpoints used in functional dyspepsia drug therapy trials. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33(6):634–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04566.x>
 32. Spiegel B, Camilleri M, Bolus R, Andresen V, Chey WD, Fehnel S, et al. Psychometric evaluation of patient-reported outcomes in irritable bowel syndrome randomized controlled trials: A Rome Foundation report. *Gastroenterology.* 2009;137(6):1944–53.e1–3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.08.047>
 33. Palsson OS, Whitehead WE, van Tilburg MA, Chang L, Chey W, Crowell MD, et al. Rome IV diagnostic questionnaires and tables for investigators and clinicians. *Gastroenterology.* 2016:S0016-5085(16)00180-3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.014>
 34. Pathipati MP, Shah ED, Kuo B, Staller KD. Digital health for functional gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterol Motil.* 2023;35(1):e14296. <https://doi.org/10.1111/nmo.14296>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: И.П. Авакьянц — написание текста рукописи, ответственность за целостность всех частей статьи; Е.А. Герасимец — сбор, анализ и обобщение данных, редактирование текста; Е.С. Петрова — интерпретация результатов, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; Д.В. Горячев — разработка концепции, критический пересмотр текста, утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Ilona P. Avakiants drafted the manuscript and agreed to be accountable for the integrity of all parts of the work. Evgenii A. Gerasimets collected, analysed, and summarised data and edited the manuscript. Elena S. Petrova interpreted the obtained results, edited the manuscript, and approved the final version for publication. Dmitriy V. Goryachev conceptualised the study, critically revised the manuscript, and approved the final version for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Авакьянц Илона Пулатовна, канд. мед. наук / Ilona P. Avakiants, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1851-5542>

Герасимец Евгений Алексеевич / Evgenii A. Gerasimets

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2409-0472>

Петрова Елена Сергеевна, канд. мед. наук / Elena S. Petrova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9981-7306>

Горячев Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук / Dmitriy V. Goryachev, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8583-2372>

Поступила 26.08.2024

После доработки 30.10.2024

Принята к публикации 04.12.2024

Received 26 August 2024

Revised 30 October 2024

Accepted 4 December 2024



О.В. Шредер
Д.В. Горячев
В.А. Меркулов

Основные принципы расчета необходимой численности участников клинических исследований. Часть 2. Анализ выживаемости (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

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Анализ выживаемости — метод биостатистики, используемый в клинических исследованиях для подтверждения эффективности и безопасности применения лекарственных средств в долгосрочной перспективе. Актуальность метода определяется оценкой возможности экстраполяции заключения о полезности медицинского вмешательства, установленного в краткосрочном клиническом исследовании, на долгосрочный период наблюдения, а также возможности коррекции режимов дозирования и схем лечения. В настоящее время отсутствуют подробные методические рекомендации по проведению исследований по анализу выживаемости.

ЦЕЛЬ. Систематизация технических требований к планированию дизайна событийного исследования в части определения размера выборки.

ОБСУЖДЕНИЕ. Обсуждены методы расчета необходимой численности субъектов для анализа выживаемости в рамках событийных исследований, в которых сбор и оценка исходов проводится в условиях цензурирования наблюдений. Описаны вероятностные модели, построенные на основе байесовской теории вероятностей, для оценки параметров выживаемости, характеризующих время и риск наступления события, а также кумулятивную долю выживших, как основных переменных для определения размера выборки участников исследования. Рассмотрены теоретические основы анализа событийного риска в дизайнах исследования выживаемости. Представлено описание гипотез, статистических моделей расчета размера выборки субъектов, определения пороговых значений параметров выживаемости в групповых последовательных дизайнах исследования событийного риска.

ВЫВОДЫ. Представленные статистические модели могут использоваться при разработке дизайнов исследований, направленных на оценку продолжительности времени до момента наступления ожидаемого события и кумулятивного риска во время лечения и после применения лекарственных средств.

Ключевые слова: выборка; клинические исследования; байесовская теория вероятностей; размер выборки; вероятностные модели; выживаемость; оценка; событийные исследования; долгосрочные исследования; краткосрочные исследования

Для цитирования: Шредер О.В., Горячев Д.В., Меркулов В.А. Основные принципы расчета необходимой численности участников клинических исследований. Часть 2. Анализ выживаемости (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(1):92–104. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-92-104>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 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.

© О.В. Шредер, Д.В. Горячев, В.А. Меркулов, 2025

Olga V. Shreder ✉ 
Dmitriy V. Goryachev 
Vadim A. Merkulov 

Basic Principles for Calculating the Required Number of Participants in Clinical Trials. Part 2. Survival Analysis (Review)

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

✉ Olga V. Shreder; shrederov@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Survival analysis is an important biostatistics method used in clinical trials to confirm the long-term efficacy and safety of medicinal products. The significance of this method lies in the possibility to extrapolate the conclusion regarding the benefits of a medical intervention drawn from a short-term clinical trial to a longer period and adjust dosages and treatment regimens accordingly. However, comprehensive methodological recommendations for planning survival analyses are currently lacking.

AIM. This study aimed to systematise the requirements for sample size calculation in event-based study designs.

DISCUSSION. This article presents methods for calculating the number of subjects required for survival analysis in event-driven studies with outcome collection and estimation under censoring conditions. The authors discuss Bayesian probabilistic models for estimating survival parameters, such as the time to an event, the risk of an event, and the cumulative survival rate, as key variables for determining the sample size for a study. The article presents a theoretical framework for event risk analysis in survival study designs. The authors describe hypotheses and statistical models for calculating sample sizes and determining survival parameter thresholds in group sequential designs for event risk studies.

CONCLUSIONS. The statistical models presented can be used to design studies aimed at estimating the time to an expected event and the cumulative risk during treatment and following medicinal product administration.

Keywords: sample; clinical trials; Bayesian probability theory; sample size; probability models; survival; estimation; event-based studies; long-term studies; short-term studies

For citation: Shreder O.V., Goryachev D.V., Merkulov V.A. Basic principles for calculating the required number of participants in clinical trials. Part 2. Survival analysis (review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(1):92–104. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-92-104>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022300127-0).

Disclosure. Dmitriy 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

Планирование клинического исследования (КИ) требует четкой формулировки целей в определении клинически важных вопросов и способов их решения с учетом основных требований к репрезентативности выборочных совокупностей участников испытаний. Формат последующего статистического анализа определяется типом планируемого дизайна и исследовательских задач [1]. Большинство регистрационных исследований лекарственных средств (ЛС) являются проспективными, имеющими четко определенные визиты начала и завершения исследования для оценки терапевтического эффекта ЛС за определенный период лечения

и постнаблюдения участников КИ (пациентов). Реже используют ретроспективный дизайн на основе изучения архивных данных ранее исследованных пациентов.

Дизайны проспективных и ретроспективных исследований в большинстве случаев разрабатываются на основе признанных регуляторами статистических моделей, предназначенных для подтверждения превосходства, не меньшей эффективности и эквивалентности новых терапевтических препаратов относительно референтного препарата или плацебо [2, 3]. Однако указанные статистические модели не всегда применимы в случаях решения исследовательских задач в концепции событийного анализа рисков,

возникающих в течение определенного периода времени наблюдения за пациентами, оценки отношения рисков и шансов развития интересующего события или прогноза исхода заболеваний при долгосрочном вмешательстве или необходимости последующего наблюдения после лечения [4, 5]. В этом случае могут быть использованы вероятностные модели Байеса, позволяющие на основе моделирования условных и безусловных предположений, определяемых как априорная и апостериорная вероятность, прогнозировать наступление интересующих исследователя событий, связанных с риском применения ЛС, а также рассчитывать мощность и объем выборки участников для различных дизайнов последовательных групповых схем лечения.

Сложность планирования дизайнов событийных исследований обусловлена тем, что для анализа событийных параметров, например выживаемости, неприменимы стандартные модели, основанные на сравнении долей и средних величин. Для прогнозирования наступления интересующих событий в некоторый момент времени наблюдения наряду с количественными методами необходимо использовать логические модели.

Оценка размера выборки для событийных наблюдений является важной частью планирования, особенно в групповых последовательных дизайнах исследования выживания, связанных с цензурированием данных и определением времени интересующих исследователя исходов. В этом смысле метод анализа выживаемости является незаменимым инструментом в исследованиях с долгосрочным вмешательством, которое сопровождается значительной частотой выбывания пациентов из исследования по причине исключения, нежелательных явлений, случаев смерти или других причин.

Цель работы — систематизация технических требований к планированию дизайна событийного исследования в части определения размера выборки.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

При формулировке научных гипотез оценки риска медицинского вмешательства в долгосрочной перспективе используются модели вероятностной статистики, основывающиеся, как правило, на положениях теоремы Байеса¹ [1]. Базовая формула теории вероятности, согласно теореме Байеса, имеет вид (1):

$$P(A|B) = P(B|A) \times P(A) / P(B), \quad (1)$$

где $P(A|B)$ — апостериорная вероятность² гипотезы A (условная вероятность), $P(A) | P(B)$ — априорная вероятность³ (безусловная вероятность), $P(A)$ — вероятность априорных предположений, $P(B|A)$ — вероятность правдоподобия⁴ (условная вероятность), $P(B)$ — данные, нормализующие⁵ апостериорную вероятность, A — предположения (гипотезы), B — известные данные (события) [4–8]. Согласно теореме Байеса при априорных предположениях можно определить вероятность наступления ожидаемого события в планируемом исследовании, выраженную в коэффициентах риска, то есть посредством отношения как средних (медианных), так и процентных (долевых) значений [9–14].

Вероятности правдоподобия определяются для каждой сформулированной гипотезы, затем по уравнению (1) можно пересчитать вероятности на основе данных, полученных в эксперименте, (2) [15].

$$P(B|A) = P \left(\frac{\text{известные данные}}{\text{предположения}} \right). \quad (2)$$

Необходимость четкого описания статистических дизайнов, основным критерием которых является оценка риска, предполагает более подробное пояснение к модификации базовой модели Байеса, в частности, это касается формулировки гипотез и выбора методов оценки клинических исходов, таких как функция выживаемости, функция риска, часто выражающая соотношения рисков и шансов ответа на медицинское вмешательство,

¹ Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 03.11.2020 № 19 «О Руководстве по применению принципов биостатистики в клинических исследованиях лекарственных препаратов».

² Апостериорная (послеопытная) вероятность принятия гипотезы A при условии, что имеются данные, полученные опытным путем (событие B), например ранее наблюдаемые в пилотном испытании или из источников литературы: $P(A|B) = P(\text{предположения} | \text{известные данные})$.

³ Априорная (доопытная) вероятность — теоретическая основа для предположения вероятности наступления условного события A из числа нескольких возможных исходов B , ранее наблюдаемых в пилотном испытании или из публикаций аналогичных исследований, позволяет оценить возможность воспроизведения подобного результата в планируемом испытании: $P(A) = P(\text{предположение})$.

⁴ Вероятность правдоподобия или вероятность получения определенного набора данных при условии, что какая-то из гипотез верна — вероятность наступления события B при условии имеющихся предположений A : $P(B|A) = P(\text{известные данные} | \text{предположения})$.

⁵ Нормализация — математическая операция, применяющаяся для приведения значений апостериорной вероятности к диапазону от 0 до 1, для этого произведение вероятности правдоподобия и априорной вероятности делят на вероятность события B согласно формуле (1): $P(B) = P(\text{известные данные})$.

и кумулятивная выживаемость участников исследования.

Метод анализа выживаемости

Выживаемость — это вероятность пережить любой из моментов времени после некоторого начального события, которая задается кривой выживаемости, определяющей долю выживших к моменту времени t от начала наблюдения t_0 . Метод анализа выживаемости используется в клинических дизайнах, направленных на оценку продолжительности периода до наступления события, интересующего исследователя. Этот метод основан на анализе функции выживаемости⁶, которая определяет вероятность наступления события в конкретный момент времени и вероятность выживания пациентов с течением времени [2, 15, 16]. За событие может быть принята как смерть пациента, так и любое другое событие: успешное излечение, исчезновение целевых симптомов заболевания, преждевременное прекращение лечения, развитие/регрессия нежелательных реакций, частотные переменные, характеризующие количество пациентов в динамике по времени излечения, рецидива или выбывания из наблюдения по разным причинам в определенные интервалы времени лечения или постнаблюдения и др.

Метод анализа выживаемости получил широкое распространение в исследованиях кардиологии [16] и онкологии [17], однако этот метод может успешно применяться в оценке любых терапевтических эффектов, диагностических критериев и исходов целого ряда заболеваний, при которых основным критерием оценки эффекта является временной фактор [16–18].

В основе анализа выживаемости лежит метод Каплана–Мейера, позволяющий определить время выживания (продолжительности события) от определенной даты начала (например, включения пациентов в исследование) до момента исхода события (времени излечения, рецидива, смерти, выбывания из исследования или другого значимого события). Такая оценка реализуется посредством расчета продолжительности времени с учетом цензурированных⁷ наблюдаемых событий или участников исследования.

График оценки Каплана–Мейера представляет собой визуализацию функции выживаемости в виде ломаных линий — горизонтальных ступеней, отражающих временные интервалы вероятности наступления события, которая рассчитывается по формуле (1), модифицированной относительно исследовательской задачи определения вероятности риска выбывания пациентов из исследования в интервале определенного времени наблюдения, и имеет вид (3):

$$\hat{P}(t_1, t_2) = \frac{d_{t_1}}{n_{t_1}} \times \frac{d_{t_2}}{n_{t_2}}, \quad (3)$$

где d_{t_1} и d_{t_2} — абсолютное число (или доля) пациентов, умерших в интервале времени t_1 и t_2 соответственно, n_{t_1} и n_{t_2} — общее число наблюдаемых пациентов в интервале времени t_1 и t_2 , и $\hat{P}(t_1, t_2)$ — вероятность риска выбывания из исследования в интервале времени t_1 и t_2 [15–19].

В контексте вероятности выживания участников исследования $\hat{P}(t_1, t_2)$ может выражаться формулой (4):

$$\hat{P}(t_1, t_2) = P(t_1) \cdot P(t_2), \quad (4)$$

где $P(t_1) = 1 - \frac{d_{t_1}}{n_{t_1}}$ и $P(t_2) = 1 - \frac{d_{t_2}}{n_{t_2}}$, $P(t_1)$ и $P(t_2)$ —

вероятность риска выбывания из исследования в интервале времени t_1 и t_2 , соответственно.

Целью анализа в данном случае является оценка вероятности выживания участников исследования с учетом риска выбывания части пациентов по разным причинам (или наступление целевого события) в определенные интервалы времени (до наступления момента времени t_1 или t_2).

Таким образом, для определенного интервала времени, в котором зарегистрировано целевое событие, оценивают вероятность пережить этот интервал времени как отношение числа выбывших (умерших) пациентов (d_t) к числу наблюдавшихся в момент времени наблюдения (n_t). Фактически отношение d_t к n_t является показателем риска выбытия (смерти) из исследования, а для определения вероятности выживания пациентов используют выражение $1 - \frac{d_t}{n_t}$.

⁶ Функция выживаемости — характеристика случайной величины, связанной с некоторым множеством событий (обозначающих смерть или выбывание по разным причинам) ко времени, которая показывает вероятность того, что событие не произойдет к определенному времени, при этом случайная величина показывает время, когда событие произошло. Часто обозначается как $S(t)$ и определяется как вероятность наступления события до определенного момента времени t : $S(t) = P(T > t)$.

⁷ Цензурированные наблюдения — наблюдения, содержащие неполную информацию о состоянии субъекта по причине его непредвиденного выбывания из исследования, на графике оценки Каплана–Мейера отмечаются знаком «+». В анализе выживаемости цензурирование может быть одно- и двусторонним (правым, левым и с обеих сторон). Для оценки разницы между группами с цензурированными данными используют несколько непараметрических критериев, например критерий Вилкоксона, F -критерий Кокса, логранговый критерий.

Вероятность для каждого участника исследования пережить несколько интервалов времени будет равна произведению этих оценок от нулевого (t_0) до заданного момента (t_1 и t_2), в соответствии с правилом умножения вероятностей [2, 15, 16]. Например, если все пациенты начали наблюдаться в момент времени t_0 , расчет длительности наблюдения и регистрация целевых событий (летальный исход или выбывание по другой причине) производится до определенных моментов времени (t_1 и t_2).

Результатом анализа является интервал времени от начала наблюдения до наступления определенного события, часто называемый временем анализа выживаемости. Пациентов, у которых не зарегистрировано событие (или выживших) на момент анализа данных, отмечают как цензурированных⁸ знаком «+». При анализе таких данных используется информация от всех участников исследования: тех, у кого событие наступило к концу исследования, и тех, у кого не наступило. Однако выводы о выживаемости участников основываются на времени наступления события и, следовательно, зависят от количества событий, наблюдаемых в исследовании.

Общая выживаемость участников исследования может быть представлена в виде формулы Каплана–Мейера для всех временных интервалов t , в которых были зарегистрированы случаи летальных исходов (5):

$$\hat{P}(t) = \prod \left(1 - \frac{d_t}{n_t} \right), \quad (5)$$

где $\hat{P}(t)$ — общая выживаемость, d_t — число умерших в интервале времени t , n_t — число пациентов, наблюдавшихся в интервале времени t , $\prod$ — символ произведения значений $\left(1 - \frac{d_t}{n_t} \right)$

для всех временных интервалов, в которых были зарегистрированы случаи выбывания (смерти) пациентов.

Рассмотрим пример расчета выживаемости методом Каплана–Мейера. Предположим, что из 10 включенных в исследование пациентов один умер через 2 месяца, один — через 6 месяцев, двое — через 7 месяцев после начала наблюдения. Вероятность умереть через 2 месяца составит $\frac{d_2}{n_2} = \frac{1}{10} = 0,1$; вероятность выжить через 2 месяца для пациентов, которые дожили до этого

времени: $P_2 = 1 - \frac{d_2}{n_2} = 0,9$. Вероятность выжить через 6 месяцев для пациентов, которые дожили до этого времени: $P_6 = 1 - \frac{d_6}{n_6} = 1 - \frac{1}{9} = 0,889$.

Вероятность выжить через 7 месяцев для пациентов, которые дожили до этого времени:

$$P_7 = 1 - \frac{d_7}{n_7} = 1 - \frac{2}{8} = 0,75. \quad \text{Таким образом,}$$

$$\hat{P}(\text{выживаемость в интервале времени } t_2, t_6 \text{ и } t_7) = P_2 \times P_6 \times P_7 = 0,900 \times 0,889 \times 0,750 = 0,600.$$

Следует отметить, что формула (5) выражает вероятность выживаемости пациентов до определенного момента времени t , рассчитанную на основе интенсивности наступления событий (летальных исходов) или функции риска, обратной оценкой которой является функция выживаемости $S(t)$, связанная с $\hat{P}(t)$ соотношением (6) [16]:

$$\hat{P}(t) = 1 - S(t), \quad (6)$$

где $S(t)$ является отношением числа выживших в интервале времени t к общему числу наблюдавшихся пациентов и определяется формулой (7).

В дизайне событийного исследования наиболее часто используемыми параметрами оценки являются функция выживаемости (дожития), функция риска (интенсивности наступления событий) и кумулятивная доля выживших [16–19].

Функция выживаемости $\hat{S}(t)$ — вероятность выживания до момента времени t , $\hat{S}(t) = P(T > t)$, где T — случайная величина времени до наступления целевого события и определяется формулой (7).

$$\hat{S}(t) = \frac{\text{число переживших момент } t}{\text{объем совокупности}} \quad (7)$$

или $\hat{S}(t) = \frac{s_t}{n_t},$

где значения $\hat{S}(t)$ могут быть в диапазоне от 0 до 1.

Пример: если из 10 наблюдаемых в течение 3 лет выжили 6 пациентов, то вероятность выживания пациента в течение 3 лет после лечения равна $S(t) = 6/10 = 0,6$.

Функция риска или интенсивности наступления событий $F(t)$ — используется для прогнозирования риска наступления событий в будущем и определяется как оценка вероятности наступления целевого события в заданный момент

⁸ Цензурированные — пациенты, которые выбывают или исключаются из исследования до наступления события в определенном интервале наблюдения и время наступления события неизвестно на момент проведения анализа выживания (выпадающие из наблюдения), или которые остались живы на момент окончания периода наблюдения.

времени, притом что это событие не наступило ранее в начальном интервале времени:
 $F_t = 1 - \frac{d_t}{n_t}$, где, d_t — число целевых событий

(выбытий, случаев смерти) в заданный интервал времени t , n_t — число участников исследования, доживших до момента времени, находящегося в интервале t .

Функция риска является обратной функции выживаемости, она может быть представлена коэффициентом риска (HR), выраженным отношением долей S_1 и S_2 или другими соотношениями, например отношением логарифмов частотных показателей (8), отношением коэффициентов показателей выживаемости (9) и медианных значений (10, 11) в зависимости от метрических характеристик исследуемых параметров выживаемости. Формула расчета HR на основе отношения логарифмов выживаемости S_1 и S_2 имеет вид (8):

$$HR = \frac{\log(S_2)}{\log(S_1)}. \quad (8)$$

Если целевым событием является рецидив заболевания, то распределение случаев выживания (выздоровления) для каждого вида лечения можно представить в виде показателя частоты, а коэффициенты риска (λ_1 и λ_2) рассчитываются как отношение частот случаев рецидива и выздоровления для каждой из групп лечения за определенный промежуток времени, однако при сравнении двух методов лечения показатель «коэффициент риска рецидивов» HR будет рассматриваться как отношение долей λ_1 и λ_2 , выраженных в диапазоне значений от 0 до 1 (9),

$$HR = \frac{\lambda_2}{\lambda_1}. \quad (9)$$

Это выражение, описывающее отношение в долях, сродни вычислению различий значений в виде $\lambda_1 - \lambda_2$ [1], которое используется при выполнении логрангового теста для сравнения двух групп лечения, но в данном случае коэффициент риска HR определяется экспоненциальным распределением не преобразованных данных λ , оценивается с использованием методов максимального правдоподобия⁹ и рассчитывается путем деления показателя риска в группе лечения λ_2 на показатель в контрольной группе

λ_1 при условии, что лечение, которое дает лучшие результаты, чем в контрольной группе, будет иметь коэффициент риска меньше единицы.

При планировании исследования можно получить информацию об ожидаемой доле выживших на основе значений контрольной и экспериментальной групп, известных из предыдущих исследований. Если коэффициент риска постоянен во времени, его можно вычислить из отношения логарифмов выживаемости S_1 или S_2 , используя уравнение (8) в модификации (10) [9, 10, 15].

Например, если выживаемость в течение 1 года при стандартном лечении составляет 0,2, а новый метод лечения увеличивает выживаемость до 0,3, то, согласно (9), HR будет равен 1,5, где разница ($\lambda_1 - \lambda_2$), выраженная в процентном соотношении, покажет увеличение выживаемости при новом лечении на 50%.

Ожидаемый эффект лечения можно оценить, рассчитав требуемое минимальное значение HR, исходя из известного S_1 для контрольной группы по уравнению (10):

$$S_2 = \exp\{HR(\log(S_1))\}. \quad (10)$$

Например, если значение S_1 равно 0,4, и показатель риска снижается на 50% (в диапазоне от 0 до 1 = 0,5), то этого достаточно для определения пользы режима лечения, как $S_2 = \exp(\log)(0,4)(0,5)) = 0,632$.

Если коэффициент риска не меняется с течением времени, то он может быть выражен через медиану выживаемости (M_1 и M_2) по уравнению (11) [6–12].

$$HR = \frac{M_1}{M_2}. \quad (11)$$

Медиана выживаемости для выборочной совокупности определяется как наименьшее время по кривой выживаемости, при котором выживаемость пациентов составляет меньше 0,5 (50%). Если число выбывших (умерших) пациентов составляет меньше половины наблюдаемой выборочной совокупности, медиану выживаемости определить невозможно. Если планируется оценка среднего значения параметра выживаемости, в качестве априорного можно использовать нормальное распределение данных, где

⁹ Оценка максимального правдоподобия (MLE) — метод оценки параметров предполагаемого распределения вероятностей с учетом некоторых наблюдаемых данных. С точки зрения байесовского подхода MLE обычно эквивалентен максимальной апостериорной оценке $P(B|A)$ с априорным распределением, которое является равномерным в интересующей области. В частотном подходе MLE является частным случаем экстремальной оценки, где целевой функцией является вероятность, и байесовская оценка совпадает с оценкой максимального правдоподобия $P(B|A)$ для равномерного априорного распределения (1), где $P(A|B)$ может рассматриваться как оценка с помощью апостериорного максимума.

среднее и дисперсия выбираются на основе известных, ранее изученных данных о параметре. Если планируется оценка доли выживших (успешных событий) на основе пропорций, то можно использовать бета-распределение¹⁰.

Кумулятивная доля выживших / функция кумулятивной выживаемости $H(t)$ — это накопленная доля выживших в периоде от начала до окончания наблюдения. Функция кумулятивной выживаемости определяется в фиксированном интервале времени t_0 как сумма вероятностей выживания до моментов времени t . Кумулятивная доля выживших определяется как события с известной интенсивностью (λ), то есть количеством событий, которые происходят независимо в фиксированном интервале времени t_0 и описываются распределением Пуассона¹¹ [15].

Коэффициент кумулятивного риска в данном случае определяется экспоненциальным распределением значений λ и оценивается с использованием оценок максимального правдоподобия. На этапе планирования необходимо получить оценку этого параметра, учитывая условие экспоненциального распределения в фиксированном интервале времени t_0 :

$$\lambda = -\frac{\log(S(t))}{t}, \quad (12)$$

где $S(t) = e^{-\lambda t}$, $t \geq 0$ — вероятность выживания в течение t лет (функция распределения кумулятивной выживаемости).

Чтобы получить оценку λ , необходимо знать только долю выживших в течение фиксированного периода времени, в случаях отсутствия потерь при последующем наблюдении $\lambda = 0$.

Пояснить вышесказанное можно на следующем примере: если параметр фиксированного времени t_0 равен 5 годам наблюдения, а доля выживших пациентов равна 0,7, то 70% пациентов выживают в течение не менее 5 лет.

Если известны доли пациентов в контрольной группе S_1 и группе лечения S_2 , которые дожили до истечения t_0 , можно определить коэффициенты риска λ_1 и λ_2 . Коэффициенты риска рассчитываются по формулам (13) [15, 20].

$$\lambda_1 = -\frac{\log(S_1)}{T_0} \text{ и } \lambda_2 = -\frac{\log(S_2)}{T_0}. \quad (13)$$

И, наоборот, зная коэффициенты риска, можно рассчитать доли пациентов S_1 и S_2 , доживших до момента t (14):

$$S_1 = \exp(-\lambda_1 t) \text{ и } S_2 = \exp(-\lambda_2 t). \quad (14)$$

Оценка коэффициента риска может быть получена на основе медианы продолжительности жизни, доли выживших после определенного периода времени наблюдения и отношения коэффициентов риска сравниваемых методов или групп исследования. HR для отношения рисков постоянных во времени в зависимости от исходных данных, условий и задач исследования аналогично (9) может иметь вид (15):

$$HR = \frac{h_2}{h_1}, \quad (15)$$

где h_1 и h_2 — величина риска для контрольной группы и группы лечения.

Тестирование гипотез в дизайнах событийных исследований

В зависимости от цели планируемого исследования и типа данных (метрических характеристик переменных) в качестве инструмента выбора параметров выживаемости⁸ применяют различные статистические методы. Основными для решения исследовательских задач по оценке событийного риска по времени наблюдения для пациентов являются методы Каплана–Мейера, Нельсона–Аалена, Кокса, логранговый тест.

Метод Каплана–Мейера применяется для определения вероятности наступления целевого события в определенный интервал времени. Основным инструментом для определения количества выживших пациентов или частоты наступления событий по времени наблюдения является цензурирование, а результатом — кривая распределения функции выживаемости. Для описания частоты событий по времени наблюдения в группах исследования используют таблицы жизни, кривые Каплана–Мейера (рис. 1), функцию выживаемости $S(t)$ и функцию кумулятивного риска, связанных отношением (6). Результаты оценки методом Каплана–Мейера могут быть представлены в виде кривой выживаемости, частоты наступления события в виде медианы или среднего значения, 95% доверительных интервалов показателей наступления

¹⁰ Бета-распределение — вероятностное распределение, описывающее случайную величину, ограниченную на интервале от 0 до 1.

¹¹ Распределение Пуассона — дискретное распределение вероятностей, которое выражает вероятность заданного числа событий, происходящих в фиксированном интервале времени. Интенсивность событий в фиксированном интервале времени обозначают λ .

событий, статистической значимости различий по показателю наступления событий в анализируемых выборках пациентов на основе критерия Вилкоксона и логранка (Мантела–Кокса) для учета различий в вероятностях события.

Кривая выживаемости (рис. 1) может применяться для описания продолжительности любых интересующих событий (процессов) [9, 10, 15, 19]. В интервале значений $[0; 1]$ на заданный момент времени (t_0) наблюдения значение $S(t)$ принимается равным 1 и в течение времени наблюдения стремится к нулю при указанном выше условии, что величина 0,5 является медианой выживаемости. Если в качестве исхода (события) будет выступать положительный ответ на лечение к некоторому моменту времени, то выживаемость $S(t)$ определяется по формуле (7). Если задачей исследования является определение числа выживших (или другого интересующего события) за период наблюдения, включающий несколько временных интервалов, необходимо применить правило умножения вероятностей в соответствии с формулой (5).

Метод Нельсона–Аалена – альтернатива методу Каплана–Мейера; может применяться для оценки кумулятивного риска, определяемого как HR, описания влияния переменных на выживаемость, в частности, на основе данных о выживших и умерших участниках исследования для оценки функции выживаемости и функции риска летального исхода. Значения, рассчитанные на основе оценок Каплана–Мейера и Нельсона–Аалена, асимптотически эквивалентны при определении одних и тех же параметров и связаны отношением (16).

$$H(t) = -\ln\{S(t)\} \quad (16)$$

и обратной функцией $S(t) = \exp\{-H(t)\}$,

где $H(t)$ – кумулятивный риск, $S(t)$ – выживаемость.

Метод Нельсона–Аалена базируется на теории случайных процессов, в частности, процессе Пуассона, описывающем независимость частоты событий в фиксированном интервале времени от числа событий, происходящих с постоянной интенсивностью в других непересекающихся интервалах времени, и подчиняется распределению Пуассона. В этом подходе для вычисления функции выживаемости и функции риска используется рекурсивное уравнение¹², которое

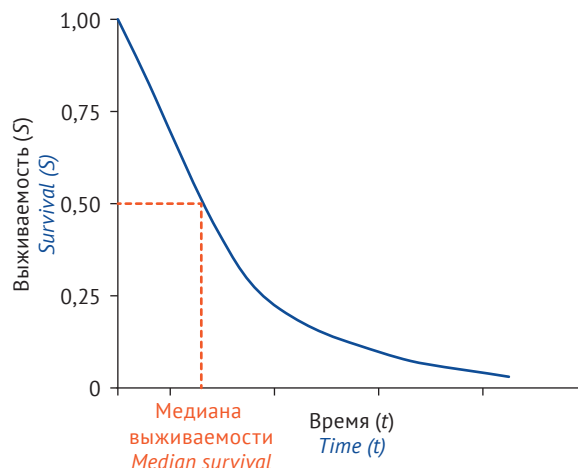


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 1. Пример типичной кривой выживаемости

Fig. 1. An example of a typical survival curve

позволяет сравнивать степень риска для пациентов, например вероятности рецидива заболевания в какой-то момент времени у пациентов с разной степенью тяжести заболевания или альтернативными методами терапии [15, 18–19].

Метод Кокса / модель пропорциональных рисков применяется для определения влияния некоторых факторов на вероятность выживания, например при оценке эффективности ЛС или прогнозировании выживаемости пациентов. Метод базируется на предположении о пропорциональности рисков, где основным инструментом является регрессионная модель Кокса для оценки влияния факторов риска наступления события (независимые переменные – предикторы) на показатели выживаемости пациентов, выраженные как функция от времени (время наступления события – функции риска) и в соответствии с основным правилом теории Байеса (1) определяет правдоподобие наступления события. В математическом выражении риск наступления события равен предельному значению условной вероятности (правдоподобию) наступления события $P(B|A)$ в интервале времени $(t, t + d_t)$ для пациентов, находящихся в группе риска на момент времени t , деленному на длину временного интервала d_t , где функция интенсивности наступления событий $F_t = 1 - \frac{d_t}{n_t}$, и в соответствии с логикой преобразований по (2) и (3) HR может быть рассчитан по формуле (5)

¹² Рекурсивное уравнение (или рекуррентное уравнение) – линейное уравнение из последовательностей, где последовательности коэффициентов могут быть представлены в виде многочленов (или линейные рекуррентные соотношения, или линейные разностные уравнения с полиномиальными коэффициентами). Рекурсивное уравнение основывается на теории рекурсивных функций и имеет вид: $a_n = f(n, a_{n-1}, a_{n-2}, \dots, a_{n-p})$, где a_n – каждый член последовательности через p предыдущих членов, n – номер члена последовательности.

[15, 18–20]. В качестве основных параметров для прогнозирования риска наступления события и оценки влияния независимых переменных на этот риск используют логарифм отношения шансов (отношения вероятностей) и значения, объясняющие переменные (факторы). Пропорциональность рисков означает, что отношение шансов для двух сравниваемых групп не зависит от времени наблюдения, то есть влияние факторов на вероятность выживания не меняется со временем, при этом регрессия Кокса предполагает, что риск наступления события для i -го пациента имеет вид (17) [15, 18]:

$$\ln h_i = \ln h_0(t) + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p, \quad (17)$$

где $h_0(t)$ — базовый риск, общий для всех пациентов; $X_1, \dots, X_p$ — независимые переменные, предикторы; $\beta_1, \dots, \beta_p$ — коэффициенты регрессии, отражающие влияние предикторов на функцию риска [20]. При увеличении значения X_i и фиксированных значениях остальных предикторов риск наступления события возрастает в $\exp(\beta_i)$ раз и в виде экспоненциальной модели выживаемости имеет вид [12, 17]:

$$h_i(t) = \exp(\alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p) \quad (18)$$

и с учетом базового риска:

$$h_i(t) = h_0(t) \exp(\alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p). \quad (19)$$

В соответствии с описанной моделью Кокса риск наступления события прямо пропорционален времени с учетом ковариат, зависящих от времени. Метод является полупараметрическим из предположения, что все переменные линейно влияют на логарифм функции риска (8) [21–23].

Логарифмический ранговый тест (логранговый тест) применяется для оценки значимости различий между исследуемыми группами по частоте событий в определенный (фиксированный) интервал времени путем сравнения времени выживания. Логранговый критерий определяет различия между группами лечения, критерий χ -квадрат определяет p -значение при условии значения альфа, равного 0,05 [1].

Логранговый критерий для сравнения кривых выживаемости используют при следующих допущениях:

- сравниваемые выборки участников (группы) являются случайными и независимыми;
- выбывание в интервале наблюдения одинаково в обеих группах;

- функции выживаемости в сравниваемых группах связаны соотношением (20):

$$S_2(t) = [S_1(t)]^\Psi, \quad (20)$$

где Ψ — отношение случаев смертей (событий). При $\Psi = 1$ кривые выживаемости совпадают, при $\Psi < 1$ участники 2 группы выбывают позже, чем в 1 группе, при $\Psi > 1$ участники 1 группы выбывают позже, чем в 2 группе [15].

Сравнение двух распределений выживаемости посредством логрангового критерия широко используется в событийных исследованиях и считается более эффективным, чем анализ, основанный на сравнении пропорций, поскольку позволяет сравнивать выживаемость в течение всего периода времени исследования, а не только в одной или двух временных точках наблюдения за пациентами. Используемые расчеты мощности предполагают экспоненциальное распределение времени выживания участников, что часто не совпадает с данными реальных клинических исследований. Тем не менее такое предположение является приемлемым, так как логарифмический ранговый тест и тест, полученный с использованием экспоненциального распределения, имеют практически одинаковую мощность в случае, если данные распределены экспоненциально. Кроме того, при использовании модели пропорциональных рисков (метод Кокса), когда данные представлены в виде соотношения рисков в соответствии с (9) и (11) и предполагается сравнение групп с помощью логрангового теста, распределение показателей выживаемости может быть преобразовано в экспоненциальное с учетом того, что условие применимости логрангового тестирования остается неизменным при монотонных преобразованиях¹³.

Таким образом, для сравнения указанных параметров выживаемости в двух и более группах исследования в большинстве случаев применяют логранговый критерий, а для оценки влияния различных факторов (категориальных или количественных переменных) на выживаемость — регрессию пропорциональных рисков Кокса. В качестве дополнительных статистических инструментов для оценки событийных исследований может применяться и ряд других критериев (табл. 1) в соответствии с целями планируемого исследования и оценочной шкалой целевых параметров выживаемости (конечных точек).

¹³ Монотонное преобразование — процедура, производимая над некоторой упорядоченной совокупностью чисел таким образом, чтобы порядок их не изменился, например методом умножения или деления каждого из них на одно и то же число, возведение в степень, извлечение корня. Основано на правилах монотонной функции $f(x)$, которая может быть либо возрастающей на некотором промежутке, либо убывающей: если $x_2 > x_1$ и $f(x_2) > f(x_1)$ — возрастающая монотонная функция, а если $x_2 > x_1$ и $f(x_2) < f(x_1)$ — убывающая монотонная функция.

Таблица 1. Рекомендуемые статистические критерии для тестирования гипотез в дизайнах событийных исследований [15, 18–21]**Table 1.** Recommended statistics for testing hypotheses in event-based study designs [15, 18–21]

Типы данных <i>Data types</i>	Сравнение двух независимых выборок <i>Comparison of two independent samples</i>	Сравнение более чем двух независимых выборок <i>Comparison of more than two independent samples</i>	Сравнение двух зависимых выборок* <i>Comparison of two dependent samples*</i>	Сравнение двух и более факторов воздействия в одной группе пациентов** <i>Comparison of two or more factors in one group of patients**</i>	Оценка взаимосвязи между двумя показателями / явлениями <i>Relationship between two estimated parameters/ events</i>
Количественные (нормальное распределение) <i>Quantitative (normal distribution)</i>	t-критерий Стьюдента <i>Student's t-test</i>	Дисперсионный анализ <i>Analysis of variance</i>	Парный t-критерий Стьюдента <i>Paired t-test</i>	Дисперсионный анализ повторных измерений <i>Analysis of variance with repeated measurements</i>	Линейная регрессия, корреляция или метод Блэнда–Алмана <i>Linear regression, correlation, or Bland–Altman analysis</i>
Качественные (бинарные) <i>Categorical (binary)</i>	Критерий χ^2 <i>χ^2 test</i>	Критерий χ^2 <i>χ^2 test</i>	Критерий Мак-Нимара <i>McNemar's test</i>	Критерий Кокрена <i>Cochran's test</i>	Коэффициент сопряженности <i>Contingency coefficient</i>
Качественные (порядковые) <i>Categorical (ordinal)</i>	Критерий Манна–Уитни <i>Mann–Whitney test</i>	Критерий Крускала–Уоллиса <i>Kruskal–Wallis test</i>	Критерий Вилкоксона <i>Wilcoxon's test</i>	Критерий Фридмана <i>Friedman's test</i>	Коэффициент ранговой корреляции Спирмена <i>Spearman's rank correlation coefficient</i>
Выживаемость <i>Survival</i>	Критерий Гехана–Вилкоксона <i>Gehan–Wilcoxon test</i>	Логранговый критерий (Мантела–Кокса) <i>Log-rank (Mantel–Cox) test</i>	F-критерий Кокса и логранговый критерий <i>Cox's F-test, log-rank test</i>	Регрессионные модели Кокса (экспоненциальная, нормальная, логнормальная, пропорциональных рисков) <i>Cox's (exponential, normal, lognormal, proportional hazards) regression models</i>	Регрессионные модели Кокса (экспоненциальная, нормальная, логнормальная, пропорциональных рисков) <i>Cox's (exponential, normal, lognormal, proportional hazard) regression models</i>

Таблица составлена авторами на основании данных литературы / The table was prepared by the authors using literature data

* Например, одна группа пациентов до и после лечения. ** Например, несколько видов лечения.

* E.g., one group of patients before and after treatment. ** E.g., several treatments.

Во всех вышеописанных подходах к анализу данных событийных исследований необходимо придерживаться определенного порядка оценивания, представления целевых параметров выживания и их интерпретации.

Порядок выполнения анализа данных событийного исследования включает:

- 1) сбор данных о вероятности выживания, времени наблюдения, рисках и факторах (в случае анализа методом Кокса), которые могут оказать влияние на вероятность выживания;
- 2) проверку предположения о пропорциональности рисков с помощью графических методов, например посредством сравнения кривых Каплана–Майера для каждой группы;
- 3) проведение анализа методом, соответствующим цели исследования и типу данных целевых параметров (оценочной шкалы). Например, для оценки влияния факторов риска наступления события следует использовать метод Кокса с определением коэффициентов регрессии и их значимости или логранговый критерий

для сравнения времени выживания с целью определения значимости различий между исследуемыми группами по частоте событий;

- 4) расчет 95% доверительных интервалов для целевых показателей выживаемости;
- 5) определение статистической значимости различий по показателю наступления событий в анализируемых выборках пациентов на основе критерия Вилкоксона и логранка (Мантела–Кокса);
- 6) представление 95% доверительных интервалов для отношения (6), (8) или разницы (7) показателей выживаемости групп сравнения;
- 7) интерпретацию результатов в контексте пропорциональности рисков или различий по параметрам выживаемости пациентов в группах исследования и тестовой статистики с подтверждением принятия или отклонения исследовательских гипотез нулевой H_0 или альтернативной H_1 на основе заданных клинически значимых пороговых значений. В процессе интерпретации данных рекомендуется представление графиков функций, определяемых как «выживание»

(кумулятивная функция дожития в линейных координатах), «1 — выживание» (функция «1 — функция дожития» в линейных координатах), «риск» (функция накопленного риска в линейных координатах) и «логарифм отношения показателей выживания» (кумулятивная функция дожития в логарифмических координатах). Если используются факторные переменные, указанные графики выживания строятся для каждой из исследуемых групп (или выборок).

Определение размера выборки в дизайнах событийных исследований

Выбор формулы для определения размера выборки планируемого дизайна исследования производится с учетом метрических характеристик конечных точек и методов последующего тестирования исследовательских гипотез, условий их применимости и ограничений [20, 21]. В рамках событийных исследований относительно конечных точек предполагается использование данных с нормальным или биномиальным распределением, определяемых в терминах событийного исследования как функция выживаемости, функция риска, кумулятивная доля выживших.

Исследовательская гипотеза может быть сформулирована в предположении о пропорциональных рисках, например коэффициента риска, который может быть получен на основе отношения медиан времени, долей целевых событий (смертность) или долей выживших до определенной (заданной) временной точки t [15].

Тестирование на основе нулевой (H_0) и альтернативной (H_1) гипотез о равенстве медианного времени выживания имеет вид: $H_0: M_T = M_C$ против $H_1: M_T \neq M_C$, где M_T и M_C — медианное время выживания для группы лечения и контрольной группы соответственно. В соответствии с предположением о пропорциональном риске гипотеза эквивалентности будет следующей: $H_0: \theta=1$ против $H_1: \theta \neq 1$, где θ — коэффициент риска = $(M_T/M_C)^y$, где y — распределение Вейбулла. Размер выборки для планируемого исследования может быть рассчитан по формуле (21). Чем выше коэффициент риска при фиксированном значении y , тем меньше размер выборки участников исследования.

$$N = \frac{2(z_{\alpha/2} + z_\beta)^2}{(\ln(M_T/M_C))^2}, \quad (21)$$

где N — размер выборки. $z_{\alpha/2}$ и z_β — соответствующие значения стандартного нормального распределения.

Гипотеза о не меньшей эффективности может быть представлена в виде: $H_0: HR \geq HR_0$ против $H_1: HR < HR_0$, где HR_0 — максимальное значение коэффициента рисков, которое позволяет сделать вывод о не меньшей эффективности (эквивалентности). При нулевой гипотезе $H_0: HR=1$. Для заданной границы не меньшей эффективности $HR_0 > 1$ (максимальный коэффициент клинической незначимости) для отношения рисков постоянных во времени в соответствии с формулой (15).

Оценка коэффициента риска (HR) может быть получена исходя из значений медианы продолжительности жизни, коэффициента риска или доли выживших после определенного периода времени наблюдения. При расчете общего размера выборки могут быть использованы данные о числе событий или пациентов в зависимости от условий и задач исследования.

Пример. Если в качестве конечной точки предполагается получить данные с биномиальным распределением, то размер выборки может быть рассчитан на основе доли пациентов с интересующими исследователя целевыми событиями по формуле (22):

$$N = \frac{2d_k}{2 - S_1 - S_2}, \quad (22)$$

где S_1 и S_2 — коэффициенты выживаемости двух групп, d_k — число целевых событий, N — общий объем выборки, который поровну делится между группами 1 и 2, то есть $N/2$.

Выражение (22) в преобразованном виде может использоваться для определения ожидаемого числа событий, которое рассчитывается на основе данных по количеству выживших, полученных в предыдущих исследованиях (или из данных литературы):

$$d_k = \frac{N(1 - S_1) + N(1 - S_2)}{2}. \quad (23)$$

Процедура статистического планирования в части определения выборочной совокупности в этом случае включает:

- 1) определение границы принятия решения (пороговой величины) на основе заданной функции распределения и альфа-значения;
- 2) определение параметра смещения относительно пороговой величины и заданном значении мощности;
- 3) расчет числа событий для каждой группы d_k в соответствии с выражением (23);

4) расчет размера выборки N по формуле (22) исходя из количества событий, рассчитанного по формуле (23).

Пример 2. Для дизайнов, основанных на сравнении кривых выживаемости двух групп пациентов посредством логрангового критерия [6–12], нулевую гипотезу формулируют в виде «в обеих группах выживаемость одинаковая» и учитывают ряд условий:

- две сравниваемые выборки независимы и случайны;
- выбывание в обеих выборках одинаково;
- функции выживаемости связаны соотношением (9), которое можно оценить как $\Psi = \frac{\ln S_2(t)}{\ln S_1(t)}$,

где $S_1(t)$ и $S_2(t)$ выживаемость в 1-й и 2-й группах в определенный период времени наблюдения t . Число целевых событий (например, смертей или рецидивов) предварительно рассчитывают по формуле (24):

$$d = (z_\alpha + z_{1-\beta})^2 \left(\frac{1 + \Psi}{1 - \Psi} \right)^2, \quad (24)$$

где Ψ — отношение целевых событий (смертей или рецидивов), z_α и $z_{1-\beta}$ — соответствующие значения стандартного нормального распределения [1].

Размер выборки участников для каждой из групп исследования может определяться по формуле (25):

$$N = \frac{d}{2 - S_1(t) - S_2(t)}. \quad (25)$$

Пусть при новом лечении выживаемость пациентов должна повыситься с 30 до 60% ($S_1=30\%$, $S_2=60\%$). Тестирование для установления значимости различий с вероятностью 80% ($z_{1-\beta}=z_{0,80}=0,84$)

планируется при уровне значимости 0,05 ($z_\alpha=z_{0,05}=1,96$), отношение целевых событий составит: $\Psi = \frac{\ln S_2(t)}{\ln S_1(t)} = \frac{\ln 0,6}{\ln 0,3} = 0,425$. Число целевых

событий составит $d = (1,96 + 0,84)^2 \left(\frac{1 + 0,425}{1 - 0,425} \right)^2 = 48,1$; тогда размер выборки для каждой из групп исследования составит $N = \frac{48,1}{2 - 0,3 - 0,6} = 43,7 \approx 44$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка эффективности медицинских вмешательств в долгосрочной перспективе и рисков, связанных с испытанием новых ЛС, в частности с выявлением нежелательных исходов в последующий после лечения период наблюдения на основе метода анализа выживаемости, позволяет скорректировать признание полезности исследуемого вмешательства как эквивалентной, так и превосходящей полезности, установленной в краткосрочном КИ.

Представленные статистические модели, критерии и термины анализа выживаемости могут использоваться при разработке дизайнов КИ, направленных на оценку продолжительности времени наступления ожидаемого события и кумулятивного риска во время длительного лечения и после применения ЛС.

Формулы расчета, включающие временные параметры оценки, обеспечивают корректность процедуры определения размера выборки участников для долгосрочных клинических исследований и согласуются с принципами, рекомендуемыми Коллегией Евразийской экономической комиссии для проведения качественного исследования с надлежащей оценкой соотношения «польза–риск» применения ЛС.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Шредер ОВ, Горячев ДВ, Меркулов ВА. Основные принципы расчета необходимой численности участников клинических исследований. Часть 1. Общие подходы (обзор). Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2024;14(3):338–50. Shreder OV, Goryachev DV, Merkulov VA. 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):338–50 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-338-350>
2. Thabane L. *Sample size determination in clinical trials*. HRM-733 Class Notes. Hamilton: St. Joseph's Healthcare; 2004.
3. Matthews JN. *An introduction to randomized controlled clinical trials*. New York: Chapman & Hall; 2006. <https://doi.org/10.1201/9781420011302>
4. Lindley DV. A statistical paradox. *Biometrika*. 1957;44:187–92. <https://doi.org/10.1093/biomet/44.1-2.187>
5. Gittins J, Pezeshk H. A behavioral Bayes method for determining the size of a clinical trial. *Ther Innov Regul Sci*. 2000;34:355–63. <https://doi.org/10.1177/009286150003400204>
6. Gittins J, Pezeshk H. How large should a clinical trial be? *J R Stat Soc Ser D Stat*. 2000;49(2):177–87. <https://doi.org/10.1111/1467-9884.00228>
7. 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>
8. Шредер ОВ, Бунятян НД, Горячев ДВ, Субаев РД, Енгальчева ГН, Кузнецова АД, Косенко ВВ. Математическое прогнозирование эффективности лекарственных средств в доклинических исследованиях. *Ведомости 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,

- Engalycheva 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>
9. Machin D, Campbell M, Fayers P, Pinol A. *Sample size tables for clinical studies*. Malden, MA: Blackwell Science; 2008. <https://doi.org/10.1002/9781444300710.ch3>
 10. Chow SC, Shao J, Wang H, Lokhnygina Y. *Sample size calculations in clinical research*. New York: Marcel Dekker; 2017. <https://doi.org/10.1080/24754269.2017.1398000>
 11. Gordon Lan KK, DeMets DL. Discrete sequential boundaries for clinical trials. *Biometrika*. 1983;70(3):659–63. <https://doi.org/10.1093/biomet/70.3.659>
 12. O'Brien PC, Fleming TR. A multiple testing procedure for clinical trials. *Biometrics*. 1979;35(3):549–56. PMID: 497341
 13. Pocock SJ. Group sequential methods in the design and analysis of clinical trials. *Biometrika*. 1977;64(2):191–9. <https://doi.org/10.1093/biomet/64.2.191>
 14. Reboussin DM, DeMets DL, Kim K, Gordon Lan KK. Computations for group sequential boundaries using the Lan–DeMets spending function method. *Control Clin Trials*. 2000;21(3):190–207. [https://doi.org/10.1016/S0197-2456\(00\)00057-X](https://doi.org/10.1016/S0197-2456(00)00057-X)
 15. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика; 1998. Glantz S. *Medico-biological statistics*. Moscow: Praktika; 1998 (In Russ.).
 16. Зулькарнаев АБ. Особенности анализа выживаемости на примере пациентов в «листе ожидания» трансплантации почки. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019;18(2):215–22. Zulkarnaev AB. Features of survival analysis on patients on the “waiting list” for kidney transplantation. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019;18(2):215–22 (In Russ.). <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-215-222>
 17. Мотренко АП. Оценка необходимого объема выборки пациентов при прогнозировании сердечно-сосудистых заболеваний. *Машинное обучение и анализ данных*. 2012;1(3):354–66. Motrenko AP. Estimation of the necessary patient sample size in predicting cardiovascular diseases. *Journal of Machine Learning and Data Analysis*. 2012;1(3):354–66 (In Russ.). EDN: OXWKKE
 18. Куликов СМ, Паровичникова ЕН, Савченко ВГ. Анализ выживаемости или событийный анализ: типовые ошибки ретроспективного метода. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2010;3(2):176–83. Kulikov SM, Parovichnikova EN, Savchenko VG. Survival or time-to-event analysis: Common pitfalls of retrospective approach. *Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice*. 2010;3(2):176–83 (In Russ.). EDN: MWJXMB
 19. Jiang Z, Wang L, Li C, Xia J, Jia H. A practical simulation method to calculate sample size of group sequential trials for time-to-event data under exponential and Weibull distribution. *PLoS One*. 2012;7(9):e444013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044013>
 20. Lachin JM, Foulkes MA. Evaluation of sample size and power for analyses of survival with allowance for nonuniform patient entry, losses to follow-up, noncompliance, and stratification. *Biometrics*. 1986;42(3):507–19. PMID: 3567285
 21. Шулика ЮЕ. Анализ выживаемости авторитарных режимов в рентно-сырьевых экономиках: возможности и ограничения модели пропорциональных рисков. *Вестник Пермского университета. Политология*. 2018;12(4):122–39. Shulika YuE. Survival analysis for authoritarian regimes in resource rent economies: Possibilities and limitations of the proportional hazards model. *Bulletin of Perm University. Political Science*. 2018;12(4):122–39 (In Russ.). <https://doi.org/10.17072/2218-1067-2018-4-122-139>
 22. Hsieh FY, Lavori PW. Sample-size calculations for the Cox proportional hazards regression model with non-binary covariates. *Control Clin Trials*. 2000;21(6):552–60. [https://doi.org/10.1016/S0197-2456\(00\)00104-5](https://doi.org/10.1016/S0197-2456(00)00104-5)
 23. Schoenfeld DA. Sample-size formula for the proportional hazards regression model. *Biometrics*. 1983;39(2):499–503. PMID: 6354290

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: О.В. Шредер — разработка концепции, написание и редактирование текста рукописи; Д.В. Горячев — критический пересмотр текста рукописи; В.А. Меркулов — разработка концепции серии обзоров.

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. Dmitriy V. Goryachev critically revised the manuscript. Vadim A. Merkulov expanded the study concept to a series of reviews.

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 / **Dmitriy V. Goryachev**, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8583-2372>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, профессор / **Vadim A. Merkulov**, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 28.10.2024

После доработки 04.12.2024

Принята к публикации 04.12.2024

Received 28 October 2024

Revised 4 December 2024

Accepted 4 December 2024



Д.В. Горячев 
И.В. Лыскова  
А.А. Черная 
Д.Д. Кушнир 

Планирование клинических исследований радиофармацевтических лекарственных препаратов: анализ международных рекомендаций и экспертного опыта

*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*

✉ Лыскова Ирина Викторовна; lysikova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Достижения в области молекулярной биологии и производственно-технические возможности позволяют разрабатывать радиофармацевтические лекарственные препараты (РФЛП), высокоспецифичные к целевым рецепторам, тканям или органам. Разработка новых РФЛП требует обязательного проведения клинических исследований (КИ). Тем не менее на данный момент в Российской Федерации и Евразийском экономическом союзе (ЕАЭС) отсутствуют документы, содержащие рекомендации по формированию досье для получения разрешения на проведение КИ РФЛП. Существует потребность в создании руководства по формированию общего плана КИ и регламентирующего объем данных, представляемых в досье КИ различных типов РФЛП.

ЦЕЛЬ. Оценка возможности использования методологических подходов зарубежных руководящих документов для разработки отечественного руководства по проведению клинических исследований РФЛП.

ОБСУЖДЕНИЕ. Проведен анализ нормативно-правовых актов Российской Федерации и ЕАЭС, а также Рекомендаций регуляторных органов Европы (Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA), Swissmedic), США и Канады, содержащих положения, регламентирующие планирование и проведение КИ РФЛП. Выделены ключевые аспекты, от которых зависит программа клинической разработки РФЛП (степень инновационности и способ клинического применения). Описаны основные этапы КИ, определены особенности планирования КИ РФЛП в зависимости от фазы разработки (выбор популяции, конечных точек, дизайна, длительности клинических исследований, специфика проведения КИ в особых популяциях пациентов). Приведены требования к содержанию досье, подаваемого в регуляторные органы с целью получения разрешения на проведение КИ РФЛП. На основании анализа результатов экспертизы протоколов КИ РФЛП, представленных в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России за период 2020–2024 гг., выделены типовые несоответствия и ошибки при формировании досье.

ВЫВОДЫ. Комплексный анализ документов, регламентирующих подходы ведущих регуляторов, и критическая оценка национального опыта проведения КИ могут послужить основой для разработки программы клинического изучения как новых диагностических и терапевтических РФЛП, так и препаратов/соединений с уже изученными свойствами, и могут быть использованы в практической деятельности экспертами, оценивающими результаты КИ, и разработчиками РФЛП.

Ключевые слова: клинические исследования; протокол; радиофармацевтические лекарственные препараты; радиофармпрепараты; эффективность; безопасность; дозиметрия; терапевтические; диагностические; руководство; регистрационное досье; тераностические пары

Для цитирования: Горячев Д.В., Лысикова И.В., Черная А.А., Кушнир Д.Д. Планирование клинических исследований радиофармацевтических лекарственных препаратов: анализ международных рекомендаций и экспертного опыта. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(1):105–120. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-105-120>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 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.

Dmitriy V. Goryachev 

Irina V. Lysikova  

Anastasiia A. Chernaiia 

Daria D. Kushnir 

Planning a Clinical Development Programme for Radiopharmaceuticals: An Analysis of International Guidelines and Expertise

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

✉ **Irina V. Lysikova;** lysikova@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Current scientific knowledge in the field of molecular biology and the associated manufacturing and technical capabilities enable the development of radiopharmaceuticals (RPs) with high specificity to the target organs, tissues, and receptors. The development of novel RPs requires mandatory clinical trials. However, at the moment, the Russian Federation and the Eurasian Economic Union (EAEU) lack documented guidance for drafting application dossiers for obtaining authorisation for clinical trials of RPs. There is a need for guidelines that will set forth recommendations for planning comprehensive clinical development programmes and regulate data submission requirements for clinical trials of various types of RPs.

AIM. This study aimed to explore whether the methodological approaches outlined in international regulatory documents can be used to inform the development of a Russian guideline for the conduct of clinical trials of RPs.

DISCUSSION. The authors conducted an extensive analysis of the Russian and EAEU laws and regulations and the guidelines by regulatory agencies in Europe (European Medicines Agency, Swissmedic), the US, and Canada that included provisions for planning and conducting clinical trials of RPs. This analysis identified the key considerations defining the clinical development programme for an RP (including its innovation level and administration route). This article describes the main phases of clinical trials and defines the phase-specific aspects of planning clinical trials of RPs. These aspects include the selection of the trial population, endpoints, design, and duration and considerations for special patient populations. The article summarises the requirements for the content of the application dossiers submitted to regulatory authorities to obtain authorisation to conduct clinical trials of RPs. The article outlines typical nonconformities and errors in application dossiers identified during the assessment of RP clinical trial protocols submitted to the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation in 2020–2024.

CONCLUSIONS. This comprehensive analysis of the documents regulating the leading regulators' approaches supplemented with the critical assessment of the Russian experience can serve as a basis for the development of clinical programmes for both novel diagnostic/therapeutic RPs and well-characterised compounds. The considerations presented in the article may be used by experts reviewing clinical trial results and by RP developers.

Keywords: clinical trials; protocol; radiopharmaceuticals; efficacy; safety; dosimetry; therapeutic radiopharmaceuticals; diagnostic radiopharmaceuticals; guidelines; registration dossier; theranostic pairs

For citation: Goryachev D.V., Lysikova I.V., Chernaya A.A., Kushnir D.D. Planning a clinical development programme for radiopharmaceuticals: An analysis of international guidelines and expertise. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(1):105–120. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-105-120>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022300127-0).

Disclosure. Dmitriy 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

В последние годы в научно-медицинском сообществе наблюдается волна интереса к возможностям, которые открывает применение диагностических, терапевтических радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП), а также соответствующих тераностических пар [1]. Современный уровень научного знания в области молекулярной биологии и производственно-технические возможности позволяют разрабатывать РФЛП, являющиеся высокоспецифичными к целевым рецепторам, тканям или органам.

В нашей стране и в мире значительное число РФЛП находится на ранних этапах клинической разработки, при этом ряд препаратов уже успешно продемонстрировал эффективность и безопасность в крупномасштабных исследованиях, пройдя затем процедуру регистрации [2]. Однако на данный момент в Российской Федерации и Евразийском экономическом союзе отсутствуют документы, содержащие рекомендации по формированию досье для получения разрешения на проведение клинических исследований (КИ) РФЛП. Важно отметить, что по состоянию на IV квартал 2024 г. консолидированных рекомендаций для индустрии по планированию, проведению и оценке результатов КИ диагностических и терапевтических РФЛП также не было выпущено такими ведущими мировыми регуляторными организациями, как Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) и Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA).

Авторами проанализированы доступные зарубежные документы, содержащие положения, релевантные для КИ разных типов РФЛП.

Так, Руководство ЕМА по клинической оценке диагностических средств¹ и Руководство FDA по разработке лекарственных средств и препаратов биологического происхождения для медицинской визуализации² детально описывают схему клинической разработки и оценки КИ препаратов, применяемых в диагностике, без указания на специфические характеристики РФЛП. Руководство по регистрации РФЛП Швейцарского агентства по лекарственным средствам (Swiss Agency for Therapeutic Products, Swissmedic)³ содержит краткую информацию по наполнению регистрационного досье в формате общего технического документа для различных групп РФЛП, информация же по представлению клинических данных ограничивается рекомендациями о предпочтительности сравнения исследуемого препарата с «золотым стандартом» для диагностических РФЛП (дРФЛП) и использования рандомизированных дизайнов КИ для терапевтических РФЛП (тРФЛП). Руководство Министерства здравоохранения Канады по требованиям к досье для РФЛП, наборов и генераторов фокусируется на специфических особенностях изучения и оценки РФЛП на всех фазах разработки⁴. К разработке РФЛП также применимы как нормы, регламентирующие проведение КИ с участием человека, такие как принципы Международной конференции по гармонизации⁵, этические принципы Хельсинкской декларации⁶, соответствующие клинические рекомендации, руководства по изучению отдельных групп препаратов или заболеваний, так и специфические требования в отношении радиационной защиты⁷.

Цель работы — оценка возможности использования методологических подходов зарубежных руководящих документов для разработки отечественного руководства по проведению

¹ CPMP/EWP/1119/98/Rev. 1. Guideline on clinical evaluation of diagnostic agents. EMA; 2010.

² Guidance for industry. Developing medical imaging drugs and biological products. Part 3: Design, analysis, and interpretation of clinical studies. FDA; 2004.

³ ZL000_00_034 v. 2.1. Guidance document. Authorization radiopharmaceutical. Swissmedic; 2023.

⁴ Guidance document. Radiopharmaceuticals, kits and generators: Submission information for Schedule C drugs. Health Canada; 2019.

⁵ [International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use.](#)

⁶ [WMA Declaration of Helsinki — Ethical principles for medical research involving human participants.](#)

⁷ [International Commission for Radiological Protection.](#)

клинических исследований радиофармацевтических лекарственных препаратов.

В работе использован информационно-аналитический метод для оценки требований ведущих регуляторных агентств к проведению КИ различных типов радиофармацевтических лекарственных препаратов. Также выполнен ретроспективный анализ 6 досье РФЛП, поданных для получения разрешения на проведение КИ в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в период 2020 – ноябрь 2024 г.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Общая характеристика клинических исследований радиофармацевтических лекарственных препаратов

Подача документов на получение разрешения проведения КИ осуществляется в рамках действия Федерального закона Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». КИ проводятся на основании разрешения, выданного уполномоченным органом исполнительной власти, при этом заявителю требуется представить в уполномоченный федеральный орган исполнительной власти соответствующий комплект документов, включая протокол КИ лекарственного препарата для медицинского применения, брошюру исследователя (БИ).

Если РФЛП подпадает под определение воспроизведенного лекарственного препарата, то проведение собственных КИ не всегда является обязательным, но при наличии дополнительных данных они могут быть проведены для подтверждения эквивалентности референтному препарату⁸, а также для подтверждения безопасности и эффективности РФЛП⁹. Если лигандом исследуемого препарата является вещество биологического происхождения, дополнительно проводится КИ по требованиям Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза¹⁰. При разработке оригинальных радиофармацевтических лекарственных препаратов требуется проведение КИ I–III фаз с соблюдением общепринятой этапности¹¹.

Программы клинической разработки РФЛП характеризуются тем, что к ним, с одной стороны,

применимы все общие требования, как и для лекарственных средств других групп, а с другой – исследования включают дополнительные элементы изучения, связанные с радиоактивностью данных соединений. Так, ключевым инструментом в оценке эффективности и безопасности РФЛП является дозиметрия.

Текущая регуляторная практика использования дозиметрии при разработке тРФЛП сильно варьирует. КИ новых препаратов не всегда включают дозиметрию и данные о поглощенной дозе для опухолевых и нормальных тканей. Универсальный подход «одна доза подходит всем» может приводить к недостаточному или избыточному воздействию, поглощенные дозы радиации при одинаковом исходном уровне активности препарата могут различаться на порядки между индивидуальными организмами [3], что приводит, с одной стороны, к неполным ремиссиям, а с другой – к развитию нежелательных реакций. Так, например, в работе [4] было отмечено, что фиксированная активность РФЛП не достигает рекомендуемой дозы 23 Гр, поглощаемой почками, и около 73% пациентов могли бы получить больше циклов терапии. Если фиксированная активность ниже предполагаемой максимальной переносимой дозы (MTD), то эффективность терапии может быть поставлена под угрозу. Дозиметрия должна быть неотъемлемой частью оценки КИ I фазы при планировании предварительной терапии для установления дозы, поглощенной органом, оценки MTD и максимально переносимой активности, а также для рекомендации дозы препарата для проведения КИ II фазы [5].

Для получения разрешения на проведение КИ необходимо подготовить БИ – сводное изложение клинических и доклинических данных, имеющих значение для изучения ЛП. Требования к оформлению и содержанию БИ устанавливаются Правилами надлежащей клинической практики ЕАЭС¹². Информация должна быть представлена в краткой, простой, объективной и лишенной рекламного оттенка форме, позволяющей потенциальному исследователю понять ее и сформировать свою собственную объективную оценку целесообразности предлагаемого исследования исходя из соотношения «польза–риск». Правила

⁸ <https://eec.eaeunion.org/comission/departament/deptexreg/formirovanie-obshchikh-rynkov/recommendations.php>

⁹ Guidance document. Radiopharmaceuticals, kits and generators: Submission information for Schedule C drugs. Health Canada; 2019.

¹⁰ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

¹¹ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 11 «О Руководстве по общим вопросам клинических исследований».

¹² Там же.

надлежащей лабораторной практики¹³ определяют минимальный объем информации, которая должна быть включена в БИ, и дают рекомендации по структуре изложения данной информации. Структура и содержание разделов БИ, посвященных доклиническим исследованиям, регламентирована Правилами надлежащей клинической практики¹⁴. При подготовке БИ рекомендуется следовать указанным выше рекомендациям с учетом специфики РФЛП.

Принципы проведения клинических исследований диагностических радиофармацевтических препаратов

Решающее значение при оценке дРФЛП имеет выбор группы пациентов. В КИ I и II фаз могут быть включены здоровые добровольцы и пациенты с подтвержденным заболеванием. В подтверждающее исследование следует включать субъектов, репрезентативных для популяции, в которой предполагается использование конкретного диагностического препарата. В основном это пациенты с неподтвержденным диагнозом, вероятность верификации/постановки которого будет выше при использовании нового препарата.

Валидацию нового диагностического препарата следует выполнять в тех же условиях, в которых будет проводиться дальнейшее обследование пациентов. Простая визуализация анатомических структур не всегда является диагностически ценной. В подавляющем большинстве случаев клиническую пользу диагностического препарата возможно продемонстрировать путем оценки его технических и диагностических характеристик¹⁵, а также оценки его влияния на диагностический поиск¹⁶. В отдельных

ситуациях может потребоваться изучение влияния дРФЛП на ведение пациента¹⁷. Если препарат обеспечивает более эффективную диагностику, но менее безопасен в сравнении с другими диагностическими процедурами, может требоваться оценка клинического исхода¹⁸. Во всех случаях производится оценка безопасности препаратов¹⁹.

Показания к применению. Показания к применению дРФЛП могут быть объединены в следующие группы: оценка анатомических структур; функциональная, биологическая и физиологическая оценка; выявление заболевания, оценка его степени развития и/или прогноз²⁰. Для каждого показания к применению дРФЛП может быть использован отдельно или в комбинации с другими диагностическими процедурами или лекарственными препаратами, необходимыми для выполнения конкретной цели. Все особенности исследования должны быть указаны в протоколе исследования.

Подтверждающие исследования. В протоколе КИ III фазы должны быть описаны цели, исследуемые вещества и методы (в том числе исследуемый препарат, абсолютный или суррогатный «золотой стандарт», препарат сравнения, а также используемые клинические оценки и процедуры), порядок проведения запланированных тестов, популяция, расчет размера выборки, обоснование конечной точки, вид ослепления, рандомизация, статистические методы, формат отчетов и их периодичность, вопросы, связанные со сбором и анализом данных, безопасностью, и другие решения.

Данные о диагностической эффективности (специфичности и чувствительности) исследуемого

¹³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

¹⁴ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 11 «О Руководстве по общим вопросам клинических исследований».

¹⁵ Технические характеристики — качество изображения и (или) преимущества/недостатки исследуемого препарата/теста. При изучении технических характеристик важна оценка точности диагностического препарата. При субъективном исходе точность оценивают по совпадению мнений наблюдателей, при объективном — по воспроизводимости теста. Диагностические характеристики — чувствительность и специфичность теста. Если результат теста основывается на пороговых значениях, компромисс между чувствительностью и специфичностью требует тщательного анализа с учетом планов по применению экспериментального теста и его влиянию на ведение пациента.

¹⁶ Влияние на диагностический поиск — влияние результата теста на вероятность постановки правильного диагноза в сравнении с вероятностью постановки диагноза до проведения теста, при этом учитывается клинический контекст (данные пациента, проведенные ранее диагностические процедуры). Все диагностические препараты должны оказывать влияние на диагностический поиск (повышение вероятности постановки правильного диагноза либо изменения диагноза); влияние на диагностический поиск следует анализировать даже в том случае, когда для данного заболевания отсутствует лечение.

¹⁷ Влияние на ведение пациентов. Оценка влияния на диагностический поиск и терапевтические решения может быть проведена с использованием опросников или путем поэтапного снятия ослепления. Для этой цели должны быть доступны данные последующего наблюдения за пациентами.

¹⁸ В случае отсутствия «золотого стандарта» для оценки влияния на клинический исход может быть использована оценка по исходу лечения пациентов при применении / не применении дРФЛП.

¹⁹ CPMP/EWP/1119/98/Rev. 1. Guideline on clinical evaluation of diagnostic agents. EMA; 2010.

²⁰ Там же.

препарата, полученные на ранних этапах его клинической разработки (КИ II фазы), следует использовать для разработки последующих подтверждающих исследований. Особое внимание следует уделять компромиссу между чувствительностью и специфичностью, принимая во внимание предполагаемое клиническое использование и обосновывая анализ мощности и допустимые пределы чувствительности и специфичности с точки зрения клинической значимости. В ряде случаев оказывается возможным достижение либо только высокой чувствительности, либо высокой специфичности, что, в свою очередь, ведет к относительно высокой частоте получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Связанные с этим потенциальные риски следует обсудить в свете потенциальных преимуществ истинно положительного или истинно отрицательного результата теста. Таким образом, отдельные расчеты мощности необходимы для достижения успеха в отношении чувствительности и специфичности. Если рассматриваемое заболевание встречается редко, размер выборки исследования определяется чувствительностью теста.

Цели исследования. Подтверждающие исследования вновь разрабатываемого дРФЛП или новых показаний для уже одобренного препарата зачастую нацелены на определение его превосходства или не меньшей эффективности в сравнении с препаратом сравнения и/или на демонстрацию допустимых пределов меньшей эффективности в сравнении с «золотым стандартом». Принципы, используемые для определения превосходства эффективности, эквивалентности или не меньшей эффективности в сравнении с другими ЛС, должны быть определены и обоснованы в протоколе КИ.

Исследуемая популяция. Для включения в КИ ранней фазы заявитель может рассматривать широкий спектр пациентов, различающихся проявлениями исследуемого заболевания, анатомическим состоянием зоны интереса, физическими данными (возраст, пол, соотношение жировой и мышечной массы). Если препарат планируется применять у пациентов с нарушением функции органов выделения (например, различной степени повреждения функций печени, включая цирроз), то таких пациентов рекомендуется включать в исследование.

Субъекты, включенные в подтверждающие КИ, должны быть репрезентативными в отношении популяции, в которой планируется применение дРФЛП. Может быть проведено КИ с привлечением:

- бессимптомных пациентов (скрининг);
- пациентов с подозреваемым, но не подтвержденным заболеванием;
- пациентов с подтвержденным заболеванием (оценка степени (первичное стадирование), тяжести или прогноза);
- пациентов, проходящих лечение (контроль эффективности лечения);
- пациентов, ранее прошедших лечение (поиск рецидива);
- пациентов с подтвержденным рецидивом (оценка степени (повторное стадирование), тяжести или переоценки прогноза).

Следует включать в КИ достаточное количество пациентов с другими состояниями, которые могут повлиять на интерпретацию результатов исследования (например, воспалительные изменения в ткани легких у пациентов с подозрением на легочные метастазы).

В протоколе следует указывать критерии отбора для участия в КИ и клинические условия, в которых будут собраны данные²¹.

Условия визуализации и оценка изображений. Термин «изображения» может относиться к отдельному изображению или к набору изображений, полученных в разных проекциях, в разной последовательности проведения диагностической процедуры и в разное время. На ранних этапах разработки рекомендуется оценить влияние изменений условий визуализации (например, время проведения визуализации после введения препарата, проекции, настройка оборудования визуализации, способ укладки пациента) на качество и воспроизводимость изображений, включая возможные ограничения применения исследуемого препарата, вызываемые изменениями этих условий. Последующие исследования эффективности КИ III фазы должны подтвердить и (или) уточнить условия применения. Методы и критерии оценки изображений (в том числе критерии интерпретации изображений, способы выбора областей интереса на изображениях, способы фрагментирования изображения для проведения дальнейшего анализа) оцениваются также на ранних этапах разработки. Это позволит установить, на какие объективные характеристики изображения (например,

²¹ Там же.

видимость поражения, относительная плотность структур) больше всего влияет изучаемый ДРФЛП и какие из них наиболее информативны для интерпретации изображения (например, для выявления злокачественности образования)²².

В протоколе следует указать референтные значения для интерпретации результатов исследования, источником которых должны быть систематические обзоры и метаанализ соответствующей литературы²³.

Этапы оценки изображений. Оценка медицинских изображений обычно состоит из двух этапов: оценка объективных характеристик изображения и интерпретация изображений. Объективные характеристики изображения — это атрибуты изображения, которые могут быть зафиксированы либо визуально, либо инструментально. Рекомендуется в документации описать любые возможные отклонения от стандартного процесса, изменения в организме, в том числе нежелательные и непредвиденные. Например, ДРФЛП, предназначенный для визуализации сердца, может также локализоваться в печени, тем самым затрудняя визуализацию сегментов сердца. Интерпретация (описание) изображений должна быть основана на объективных количественных и (или) качественных данных, полученных из изображений²⁴. Для обеспечения объективности необходимо для интерпретации изображений привлечь «ослепленных» наблюдателей²⁵.

Конечные точки. Для использования препарата по новым показаниям необходимо обосновать клинические переменные, указывающие на наличие или отсутствие заболевания, степень нарушения функции органа. Конечные точки могут включать диагностические показатели (чувствительность и специфичность), прогностические показатели, коэффициенты вероятности, оценку прогноза, влияние на диагностический поиск, на ведение пациентов или на клинический исход.

Для большинства ДРФЛП в качестве конечных точек наиболее критичными являются специфичность и чувствительность. Улучшение этих параметров приводит к повышению достоверности диагноза.

В отдельных случаях, когда отсутствует «золотой стандарт» (или его невозможно точно определить), критерием клинической пользы исследуемого препарата является позитивное влияние на ведение пациентов или улучшение клинического исхода. Если диагностический препарат используется в процедуре с количественными результатами, то повышение точности измерения соответствующего параметра может выступать конечной точкой в сравнительных исследованиях при условии, что другие параметры диагностической эффективности остаются неизменными.

«Золотой стандарт». Под «золотым стандартом» подразумевается метод оценки истинного состояния пациента или каких-либо его показателей, позволяющий независимо определить те же переменные, которые анализируют при использовании диагностического препарата. «Золотой стандарт» служит для демонстрации достоверности результатов, полученных при применении исследуемого ДРФЛП, и оценки эффективности диагностики. При планировании КИ с использованием «золотого стандарта» определяют гипотезу об ожидаемой диагностической эффективности исследуемого препарата относительно «золотого стандарта» в конкретной популяции и при конкретных клинических условиях.

В случае отсутствия «золотого стандарта» для получения наиболее приближенной к истинной оценки состояния пациента используют суррогатный стандарт (комбинация тестов, клинических данных, повторных диагностических обследований) и наблюдения в динамике. Выбор суррогатного стандарта должен быть тщательно описан и обоснован.

Препарат сравнения. В особых случаях может оказаться невозможным или неэтичным определение «золотого стандарта». В этом случае критерием оценки перекрестного исследования может выступать соответствие результатов, полученных с использованием хорошо известного препарата сравнения. Выбранный препарат сравнения должен быть подходящим, одобренным для заявленных показаний и применяться в современной клинической практике. Выбор препарата сравнения должен быть обоснован, а соответствующие процедуры четко описаны.

²² Guidance for industry. Developing medical imaging drugs and biological products. Part 3: Design, analysis, and interpretation of clinical studies. FDA; 2004.

²³ Guidance document. Radiopharmaceuticals, kits and generators: Submission information for Schedule C drugs. Health Canada; 2019.

²⁴ Guidance for industry. Developing medical imaging drugs and biological products. Part 3: Design, analysis, and interpretation of clinical studies. FDA; 2004.

²⁵ Guidance document. Radiopharmaceuticals, kits and generators: Submission information for Schedule C drugs. Health Canada; 2019.

Сравнение должно включать оценку данных эффективности и безопасности.

Использование плацебо. В случаях если дРФЛП не предназначен для визуализации, для определения его эффективности не используют дизайн с использованием плацебо, за исключением случаев, когда ответ на диагностический тест анализируют на основании субъективных критериев оценки. Тем не менее важно минимизировать степень возможной предвзятости наблюдателя в трактовке результатов, а при ее возникновении провести критическую оценку в предоставленной документации.

Дизайн исследования. Для группового сравнения используется либо внутригрупповой дизайн, либо дизайн исследования с параллельными группами. Внутригрупповой дизайн подразумевает сравнение исследований, проведенных у одного испытуемого с использованием исследуемого препарата, «золотого стандарта» и, по возможности, препарата сравнения. Преимущество данного дизайна исследований заключается в потенциальном снижении вариабельности и, следовательно, уменьшении отклонения оценок диагностической эффективности теста. В некоторых случаях может потребоваться дизайн испытания с параллельными группами вместо внутригруппового дизайна, например если количество диагностических тестов, которые могут быть выполнены с участием одного и того же субъекта, должно быть ограничено, например из-за инвазивного характера, кумулятивного облучения или эффекта переноса одного или обоих продуктов.

Рандомизация. В КИ с дРФЛП могут быть выполнены два вида рандомизации: рандомизация пациентов на две параллельные группы и рандомизация порядка использования диагностических препаратов.

Порядок использования препаратов (исследуемый препарат, препарат сравнения и другие диагностические препараты/процедуры) может быть рандомизирован, если только такая рандомизация не считается неуместной (например, когда «золотой стандарт» включает инвазивные процедуры). Специфика дизайна таких исследований заключается в том, что второй тест оценивается при отсутствии результатов первого теста.

В случае невозможности выполнения всех процедур вследствие высокой диагностической

нагрузки у одного и того же пациента необходима рандомизация в две параллельные группы. В этих ситуациях одна группа пациентов получает исследуемый препарат и «золотой стандарт», а вторая получает препарат сравнения и «золотой стандарт». Порядок введения препаратов здесь также может быть при необходимости рандомизирован.

Ослепление. В большинстве случаев диагностические препараты для визуализации оценивают при условии ослепления. Процедура ослепления также важна при оценке субъективных параметров. Виды ослепления в КИ дРФЛП: полное ослепление, ослепление до получения результатов, последовательное раскрытие рандомизационного кода и анализ без ослепления. В исследованиях эффективности рекомендуется использовать алгоритм анализа изображений с полным ослеплением или с ослеплением до получения результатов²⁶.

Исследования I фазы направлены на оценку фармакокинетических параметров и безопасности использования препарата у человека при однократном использовании и при повышении дозы диагностического препарата. Если мишенью препарата является метаболический процесс, специфические рецепторы или определенные органы или ткани с высоким сродством, следует провести фармакодинамические исследования. Рекомендуется включить в КИ задачу изучения динамики распределения препарата в органах и тканях для оптимизации алгоритмов проведения визуализации и расчета дозы излучения. При необходимости следует провести фармакокинетические и фармакодинамические оценки «холодного» компонента дРФЛП, в том числе носителя или лиганда, особенно при наличии большого количества «холодных» компонентов²⁷. КИ фазы I могут выполняться с привлечением здоровых добровольцев или пациентов, однако требуется обоснование безопасности их участия с учетом рисков экспозиции²⁸.

Исследования II фазы направлены на определение дозы (включая дозу лиганда, где применимо) или режима дозирования, которые будут использоваться в КИ III фазы, получение предварительных данных по эффективности и безопасности и оптимизацию методики и сроков оценки (к примеру, для получения образцов крови или получения изображений,

²⁶ Guidance for industry. Developing medical imaging drugs and biological products. Part 3: Design, analysis, and interpretation of clinical studies. FDA; 2004.

²⁷ Там же.

²⁸ CPMP/EWP/1119/98/Rev. 1. Guideline on clinical evaluation of diagnostic agents. EMA; 2010.

оценку технических характеристик изображения). КИ II фазы важны для разработки методик и критериев, по которым будут оцениваться изображения и/или результаты испытаний. Исследования дозозависимого эффекта в КИ II фазы обычно для РФЛП не требуются. Для получения предварительных данных о безопасности требуется исследование, включающее как пациентов с известным заболеванием, так и здоровых участников. Во время КИ II фазы, насколько возможно, должен использоваться препарат с таким составом, который планируется в дальнейшем вывести на фармацевтический рынок. В случае внесения изменений в состав препарата, потребуются дополнительные исследования биоэквивалентности и (или) другие промежуточные исследования для подтверждения актуальности данных, полученных с помощью исходного состава.

В случаях визуализационных диагностических препаратов в качестве первичной конечной точки рекомендуется использовать качество полученных изображений. КИ II фазы могут быть также направлены на оценку диагностической эффективности препарата. Диагностическая эффективность может выступать вторичной конечной точкой для всех диагностических препаратов²⁹.

Исследования фазы III направлены на установление эффективности диагностического препарата у определенной группы пациентов (например, у пациентов с неподтвержденным диагнозом) на том этапе процесса диагностики и принятия решения относительно ведения пациента, который будет использоваться в дальнейшей клинической практике. В многоцентровых КИ III фазы должны оцениваться однородность, воспроизводимость и качество используемых методов и оборудования во всех центрах до начала КИ.

До начала разработки дизайна КИ следует определить цели и конечные точки. Первичная переменная эффективности должна быть клинически значимой и поддающейся оценке/измерению у всех пациентов. Использование нескольких первичных конечных точек следует избегать; превосходство или не меньшую эффективность в отношении как чувствительности, так и специфичности рассматривают как одну комбинированную первичную конечную точку.

Когда заявлены несколько показаний, КИ могут быть выполнены в разных клинических условиях, каждое из которых будет соответствовать конкретному показанию и способу применения. Дизайн КИ III фазы (например, дозировка, методы и время визуализации, популяция пациентов и конечные точки) следует разрабатывать на основании результатов КИ II фазы. В КИ желательно использовать препарат, планирующийся для производства, или (в случае изменений состава препарата или места его производства) провести связующие исследования. В случае проведения нескольких КИ эффективности исследования могут иметь различный дизайн. КИ рекомендуется проводить независимо друг от друга и привлекать к расшифровке и оценке «ослепленных» специалистов различных клинических центров и исследовательских учреждений³⁰.

Исследования не меньшей эффективности или превосходства. КИ могут быть проведены в дизайне доказательства не меньшей эффективности, превосходства, или и того, и другого. Выбор того, является ли превосходство или не меньшая эффективность приемлемой гипотезой КИ, требует тщательного обоснования на начальном этапе планирования КИ. Если в КИ не удастся подтвердить гипотезу превосходства, гипотеза может быть изменена на «не меньшая эффективность», однако предварительно следует определить и обосновать пределы показателей не меньшей эффективности. КИ не меньшей эффективности проводятся на фоне препарата сравнения, как правило, путем сравнения результатов, полученных у одного пациента. Обоснование предела не меньшей эффективности зависит не только от клинических условий, но также от ожидаемой диагностической эффективности, влияния на использование других диагностических препаратов/процедур в соответствующих клинических условиях и от их контекста (чрезвычайная ситуация, наличие альтернативных вариантов)³¹.

Статистические решения. В КИ III фазы в качестве комбинированной первичной точки рассматриваются чувствительность и специфичность РФЛП. Чувствительность и специфичность должны быть с точностью определены, чтобы в зависимости от распространенности

²⁹ Guidance for industry. Developing medical imaging drugs and biological products. Part 3: Design, analysis, and interpretation of clinical studies. FDA; 2004.

³⁰ CPMP/EWP/1119/98/Rev. 1. Guideline on clinical evaluation of diagnostic agents. EMA; 2010.

US Food and Drug Administration. Developing medical imaging drug and biological products. Part 3: Design, analysis, and interpretations of clinical studies.

³¹ EMA Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on clinical evaluation of diagnostic agents.

заболевания можно было рассчитать положительные и отрицательные прогностические значения. Для обоснования расчета размера выборки необходимо сформулировать гипотезы, соответствующие выбранным целям. КИ III фазы должны описывать преимущества нового диагностического препарата, то есть возможность замены более инвазивного теста или процедуры или увеличение чувствительности и/или специфичности по сравнению с существующим препаратом сравнения.

Целевые значения специфичности и чувствительности должны быть сформулированы проспективно. Расчет размера выборки основывается на предполагаемых значениях чувствительности и специфичности и их доверительных интервалах или путем формулирования соответствующих односторонних гипотез. При сравнении нового и референтного препаратов, чувствительность и специфичность которых определяются по отношению к «золотому стандарту», предполагаемые значения превосходства или не меньшей эффективности в отношении чувствительности и специфичности должны быть указаны в протоколе³².

Следует предоставить подробную информацию о статистическом подходе, который будет использоваться для сравнения оценок диагностических параметров, полученных в текущем исследовании, с референтными значениями, полученными из литературы, указанной в протоколе, включая критерии успешности исследования³³.

Поправка на множественность сравнений, возникшую в результате оценки чувствительности и специфичности, обычно не требуется, поскольку необходимо отвергнуть обе первичные гипотезы, но необходимо учитывать ее влияние на общую статистическую мощность испытания³⁴.

Принципы клинической оценки терапевтических радиофармацевтических препаратов

К тРФЛП, применяемым для лечения, в том числе для контроля течения определенных заболеваний или состояний, обычно применим подход к плану клинической разработки, аналогичный таковому для терапевтических лекарственных препаратов любого происхождения. С учетом

сложности и рисков применения препаратов этой группы, связанных с присутствием в составе радиоактивных изотопов, критерии эффективности и дизайн КИ должны быть направлены на демонстрацию преимуществ перед стандартными терапевтическими подходами или оценивать эффект в популяциях, не отвечающих на стандартную терапию.

В случае использования лиганда биологического происхождения в составе тРФЛП необходимо проведение исследований «холодного» препарата³⁵.

В онкологии приемлемым показателем пользы тРФЛП для пациентов в большинстве случаев считается выживаемость без прогрессирования, однако величина эффекта лечения должна быть достаточно большой, чтобы компенсировать риски и техническую сложность применения препаратов. Как с клинической, так и с методологической точек зрения наиболее желаемый исход КИ — демонстрация положительного влияния на общую выживаемость. Этот принцип актуален также для запланированных промежуточных и перекрестных анализов, которые проводятся, если данные о выживаемости позволяют оценить соотношение «польза–риск» для исследуемого препарата. Оценка соотношения «польза–риск» должна не только включать всю значимую информацию об эффективности и безопасности ЛП, но и учитывать неточности и возможное влияние внешних факторов, имеющих отношение к изучаемому веществу и соответствующему заболеванию.

На всех этапах клинической разработки тРФЛП исследуемой популяцией являются пациенты, поскольку доза радиации и (или) токсичность при введении многократных доз исключают возможность изучения препарата у здоровых добровольцев. Большинство препаратов изначально разрабатываются для взрослых пациентов. Если тРФЛП планируется разрабатывать для применения в педиатрической практике, то следует учитывать необходимость последовательного выделения соответствующих возрастных когорт пациентов в отношении поглощенной дозы излучения и других составляющих плана разработки.

При разработке тРФЛП следует учитывать такие специфические факторы, как:

³² EMA Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on clinical evaluation of diagnostic agents.

³³ Radiopharmaceuticals, kits and generators: Submission information for Schedule C drugs. Health Canada; 2019.

³⁴ EMA Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on clinical evaluation of diagnostic agents.

³⁵ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

- использование дизайнов исследований превосходства. Выбор дизайна не меньшей эффективности может быть сделан только в случае высокой степени обоснованности существования преимуществ, так как риски применения тРФПЛ обычно существенны;
- изучение того, как лечение исследуемым препаратом согласуется с существующими терапевтическими схемами, в том числе:
 - 1) влияние исследуемого тРФПЛ на последующую альтернативную терапию, в том числе фармакотерапию, повторные курсы терапии при прогрессировании или рецидиве и т.д.;
 - 2) наличие данных, демонстрирующих, что клиническая эффективная доза — это наименьшая допустимая поглощенная доза излучения, обеспечивающая желаемый терапевтический эффект (принцип ALARA (as low as reasonably achievable, «настолько мало, насколько возможно» / «разумно достижимый минимум»))³⁶;
 - 3) изучение долгосрочной безопасности, когда препарат планируется использовать для лечения с целью продления жизни, а не для симптоматического применения, например при паллиативном лечении боли, при терминальной стадии заболевания.

Спонсор должен указать в протоколе цели исследования, исследуемые популяции и конечные точки исследования (первичные и вторичные), а также план статистического анализа. Необходимо обосновать критерии для начала лечения тРФПЛ, предполагаемой линии фармакотерапии, включения пациентов в исследование, оценки ответа и выбора терапии сравнения, базирующиеся на научных данных и (или) общепризнанных и актуальных принципах лечения в отношении целевого заболевания.

При описании включенных в КИ пациентов следует указать параметры опухоли (стадия, степень распространенности, экспрессия определенных мишеней), другие биомаркеры, важные для прогноза, чувствительность опухоли к предшествующей терапии (наличие ответа / резистентность / рефрактерность, другие характеристики, важные для описания состояния и назначения терапии), общее состояние, наличие сопутствующих заболеваний, степень органной дисфункции и т.д.

Следует рассмотреть стратификацию, основанную на хорошо обоснованных прогностических факторах. В случае проведения скорректированного анализа ковариат, отличных от используемых для стратификации, они должны быть предварительно определены в протоколе или плане статистического анализа.

В случае редких и орфанных заболеваний спонсор может определить целевую популяцию, используя альтернативные критерии включения. Например, в КИ, изучающие активность лекарственного средства, нацеленного на конкретную молекулярную мишень, которая считается ключевой для патогенеза, могут быть включены пациенты с формально различным гистологическим диагнозом. В этом случае необходимо продемонстрировать ключевую роль мишени при различных гистологических диагнозах. Следует, однако, отметить, что проверка такой гипотезы не всегда может быть проведена с достаточной статистической мощностью.

Рандомизация и стратификация должны соответствовать общим принципам, изложенным в документах Международного совета по гармонизации³⁷, а также рекомендациям, представленным в Руководствах ЕАЭС³⁸. Во многих случаях есть существенные ограничения применения двойного слепого дизайна из-за очевидных различий в токсичности при различных режимах исследования или из-за проблем безопасности. Если КИ планируется открытым, то должны быть приняты меры для ограничения риска системных ошибок, связанных с открытым характером исследования, в том числе корректный выбор конечных точек исследования, независимая оценка результатов, анализ чувствительности метода.

При планировании важно оценить возможность получения достаточной информации о безопасности при выбранном дизайне КИ.

Если запланированные графики лечения в клинике различаются между рандомизированными группами, дизайн КИ должен быть направлен на минимизацию различий, например путем планирования визитов в форме аудио- или видеосвязи (телефонных звонков).

Следует по возможности запланировать проведение сравнительных исследований в двух

³⁶ [International Commission for Radiological Protection](#).

³⁷ ICH Harmonised Tripartite Guideline. Statistical principles for clinical trials E9.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Choice of control group and related issues in clinical trials E10.

³⁸ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 11 «О Руководстве по общим вопросам клинических исследований».

Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 03.11.2020 № 19 «О Руководстве по применению принципов биостатистики в клинических исследованиях лекарственных препаратов».

группах с целью оценки безопасности препарата. В дальнейшем необходимо проспективное получение данных по безопасности после регистрации препарата, особенно если запрашивается и обосновывается возможность условной регистрации.

Исследования I фазы — оценка фармакокинетических параметров и первичной безопасности исследуемого тРФЛП с учетом дозы по массе препарата и биораспределения, возможных вторичных фармакодинамических эффектов; а также оценка фармакодинамики в тех случаях, когда тРФЛП предназначен для воздействия на рецепторы, метаболические процессы или органы с высоким сродством к изучаемой молекуле. В КИ I фазы включают только пациентов.

Исследования II фазы — определение режима дозирования с целью уточнения клинически значимого и эффективного диапазона массовых доз и радиационной активности, которые будут изучаться в последующих КИ III фазы. В КИ II фазы подтверждаются фармакокинетические и фармакодинамические характеристики, а также оптимизируются методики и сроки фракционированной терапии. Производится сбор предварительных данных о безопасности и эффективности у пациентов.

Исследования III фазы — как правило, крупномасштабные КИ, направленные на установление эффективности и детальное охарактеризование профиля безопасности исследуемого тРФЛП в целевой популяции пациентов в предполагаемых условиях и по показаниям, соответствующим реальному клиническому применению. При разработке дизайна КИ III фазы учитываются данные, полученные в КИ II фазы. В данной фазе используют тРФЛП того же состава и лекарственной формы, которые предназначены для полномасштабного производства. В случае внесения изменений в состав, лекарственную форму исследуемого ЛП необходимо проведение дополнительных исследований.

Статистические решения. В целом следует руководствоваться принципами, изложенными в Руководстве ЕАЭС³⁹ и Руководствах Международного совета по гармонизации

(International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)⁴⁰ (далее — ICH E9 и ICH E10).

В протоколе КИ должны быть описаны:

- дизайн, проведение и статистический анализ исследования;
- первичная конечная точка или точки; вторичные конечные точки с конкретизацией роли последних в общей интерпретации результатов исследования;
- меры по минимизации предвзятости, особенно в открытых КИ с субъективными конечными точками;
- обоснование того, что протокол в предложенном виде обеспечит получение достаточного количества данных высокого качества, позволяющих провести надежную оценку эффективности и безопасности исследуемого тРФЛП;
- основания для внесения в будущем возможных поправок;
- информация о том, предназначено ли КИ для демонстрации превосходства над выбранным препаратом сравнения или для демонстрации не меньшей эффективности или эквивалентности, в соответствии с принципами ICH E10.

План статистического анализа должен соответствовать принципам ICH E9 и финализирован (включая все поправки) до снятия ослепления с данных исследования.

В плане КИ должны быть детально описаны статистическая методика, которая будет применяться в КИ, обработка отсутствующих данных и раннего выхода из КИ, а также контроль частоты ошибок первого рода, обусловленных множественным тестированием.

Следует учитывать особенности оцениваемых конечных точек, например:

- при проведении КИ с событийными критериями с использованием «онкологических» конечных точек, таких как «выживаемость без прогрессирования», особое внимание следует уделить сбору, отчетности и анализу таких конечных точек⁴¹. В случае КИ тРФЛП, предназначенных для паллиативного лечения боли с использованием субъективных

³⁹ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 03.11.2020 № 19 «О Руководстве по применению принципов биостатистики в клинических исследованиях лекарственных препаратов».

⁴⁰ ICH Harmonised Tripartite Guideline. Statistical principles for clinical trials E9.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Choice of control group and related issues in clinical trials E10.

⁴¹ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 11 «О Руководстве по общим вопросам клинических исследований».

Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 03.11.2020 № 19 «О Руководстве по применению принципов биостатистики в клинических исследованиях лекарственных препаратов».

самоотчетов, спонсор должен предоставить доказательства того, что конкретный опросник, выбранный для оценки боли, был валидирован в популяции, аналогичной той, которая оценивается в данном исследовании. Спонсор также должен представить доказательства того, что в начале исследования были приняты меры по минимизации предвзятости в субъективной отчетности о боли. Спонсор должен дополнительно:

- 1) представить обсуждение клинической пользы конкретной конечной точки, выбранной для демонстрации влияния тРФЛП на боль;
- 2) представить инструкции по использованию сопутствующих анальгетиков, разрешенных протоколом;
- 3) обеспечить сбор, регистрацию и надлежащий анализ подробной информации об использовании любых дополнительных обезболивающих ЛП, представить результаты оценки влияния дополнительных обезболивающих ЛП на первичные и вторичные показатели эффективности⁴².

Типичные ошибки при составлении протоколов клинических исследований РФЛП: анализ регистрационной практики

В соответствии с положениями нормативных правовых актов⁴³, регламентирующих требования к комплектации досье, включая протокол КИ, подача документов с целью получения разрешения проведения исследования возможна только при наличии доказательства безопасности РФЛП и характеристики ряда фармакокинетических параметров, полученных на доклиническом этапе изучения ЛП. В некоторых ситуациях возможно воспользоваться результатами исследований, полученными из открытых источников литературы. В любом случае на этапе планирования первого исследования препарата программа клинической разработки должна быть обоснована и представлена в составе досье препарата, так как адекватный выбор необходимых исследований позволит рационально использовать имеющиеся у разработчика ресурсы и свести к минимуму вероятность неудач.

Нами был выполнен ретроспективный анализ 6 протоколов КИ РФЛП. Во всех проанализированных досье отсутствовала информация о программе клинической разработки ЛП,

что послужило причиной запроса этих данных, включая одновременные рекомендации относительно возможных вариантов дальнейших исследований разрабатываемого продукта. При этом принималось во внимание наличие доступной информации, касающейся аналогичных ЛП, в открытых источниках.

В протоколах, поданных на экспертизу, не всегда была обоснована очередность включения в КИ когорт пациентов, которым планировалось введение препарата в следующем дозовом режиме, и не всегда была четко указана дозолимитирующая токсичность. Совокупность таких ошибок может увеличить риск развития серьезных нежелательных реакций, особенно отсроченных во времени, у последующих когорт пациентов.

В 5 протоколах из 6 было выявлено несоблюдение этапности, что стало причиной замечаний экспертов, включая, в том числе, рекомендацию о создании независимого комитета по мониторингу данных, в обязанности которого входят мониторинг безопасности, оценка возможности продолжения исследования⁴⁴. Заявителям следует учитывать возможность оформления промежуточного отчета для подачи в регуляторный орган в случае предполагаемого КИ с обоснованным объединением нескольких ранних фаз, при этом промежуточный анализ (промежуточные анализы) необходимо заранее тщательно спланировать и описать в протоколе исследования. Особенно это критично, когда речь идет о первом применении ЛП у пациентов/добровольцев.

Учитывая особенности изучаемых ЛП, следует уделять повышенное внимание проблеме радиационной безопасности как для пациента/добровольца, так и для медицинского персонала. Частой ошибкой являлось отсутствие сведений о необходимости проведения дозиметрии у пациентов для определения остаточной активности и возможности выписки из стационара пациентов, не представляющих опасности для окружающих. При этом в большей части протоколов были указаны необходимые конкретные сведения по особенностям обращения с ЛП на этапе его перемещения, приготовления и последующего введения.

Еще одной причиной замечаний, связанных с оценкой безопасности, является отсутствие

⁴² Radiopharmaceuticals, kits and generators: Submission information for Schedule C drugs. Health Canada; 2019.

⁴³ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения»; от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

⁴⁴ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 03.11.2020 № 19 «О Руководстве по применению принципов биостатистики в клинических исследованиях лекарственных препаратов».

данных о периоде последующего наблюдения, длительность которого обоснована с точки зрения физических и фармакокинетических характеристик изучаемого РФЛП, либо его недостаточная продолжительность.

При выборе популяции для включения в КИ большинство несоответствий выявлено в разделе «Критерии включения». Обращает на себя внимание желание разработчика включить в КИ пациентов с максимально возможным числом нозологий при отсутствии подробного и обоснованного доказательства целесообразности сделанного выбора. Несмотря на имеющийся высокий терапевтический потенциал РФЛП, рекомендуется включать в КИ (особенно при первом применении нового препарата) пациентов с исчерпанными доступными ресурсами разрешенных способов лечения, а также тех, для которых ожидается наибольший эффект от данной терапии.

Частой ошибкой, допускаемой при оформлении раздела «Критерии не включения», являлось отсутствие информации о необходимости соблюдения мер контрацепции как во время КИ, так и в течение обоснованного по длительности периода после последнего введения РФЛП. В тех протоколах, где предполагалось включение женщин с сохраненным детородным потенциалом, не было указано ограничений, связанных с беременностью и периодом грудного вскармливания.

По большей части в протоколах имелись указания на ограничения включения в исследование особых популяций пациентов (пациенты с нарушениями функции почек или печени, пациенты детского возраста и др.), однако в некоторых случаях были сделаны замечания относительно некорректного включения в КИ пациентов с определенными биохимическими и гематологическими показателями.

Одним из сложных и критичных моментов разработки протоколов КИ является выбор конечных точек исследования. И если в случае протоколов КИ I фазы этот вопрос в целом считается решенным, то в случае последующих фаз — это достаточно сложная задача, требующая тщательной проработки, поскольку получение данных, подтверждающих возможность достижения конкретного результата, включая доказательства эффективности при допустимом уровне

безопасности, напрямую зависит от выбора конечных точек. Однако недостаточно только обосновать выбор первичных и вторичных конечных точек, следует аргументированно доказать приемлемость указанных в протоколе временных сроков для оценки выбранных параметров. И здесь еще раз необходимо подчеркнуть важность требования к изучению долгосрочной безопасности РФЛП, особенно предлагаемого для использования в терапевтических целях.

Эти положения подтверждаются проведенным анализом протоколов. Замечаний по выбору конечных точек в протоколах с первым применением нового РФЛП не было. В то же время более чем в 50% проанализированных протоколов была выявлена необходимость корректировки разделов, связанных с определением конечных точек. По факту получения замечаний разработчиками были внесены обоснованные изменения в протоколы КИ. Однако следует помнить, что изменение первичной конечной точки приводит к внесению изменений в большинство значимых разделов протокола исследования, таких как дизайн КИ, расчет размера выборки, способы оценки параметров эффективности, описание визитов [6].

Еще одной ошибкой, встречающейся при составлении протокола КИ, является необоснованность расчета размера выборки [6]. Количество включенных субъектов КИ зависит от исследуемого заболевания, цели исследования и его конечных точек. Согласно требованиям⁴⁵ количество субъектов должно быть достаточно большим для получения надежного ответа. При расчете необходимо учитывать тестируемую гипотезу, вариабельность данных, использовать заранее оговоренную статистическую значимость, а также учитывать наличие/отсутствие требуемой информации, необходимость группового анализа, множественности сравнения, оценки вторичных конечных точек и др.

Если для КИ I фазы допустимо отсутствие обоснования объема выборки с точки зрения целей и задач этого этапа разработки ЛП, когда, как правило, используется дизайн «3+3» (определение максимальной переносимой дозы путем оценки пошагового увеличения доз у небольшого числа пациентов на каждом уровне дозы в течение коротких периодов времени до заранее определенного уровня тяжелой или опасной для жизни

⁴⁵ Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 11 «О Руководстве по общим вопросам клинических исследований»; от 03.11.2020 № 19 «О Руководстве по применению принципов биостатистики в клинических исследованиях лекарственных препаратов».

⁴⁶ Guidance for industry. Optimizing the dosage of human prescription drugs and biological products for the treatment of oncologic diseases. FDA; 2024.

токсичности, ограничивающей дозу (дозолимитирующей токсичности))⁴⁶, то для последующих фаз, особенно КИ III фазы, наличие статистического плана является обязательным условием. Однако из 6 проанализированных протоколов КИ РФЛП только в 1 (16,7%) планировалось проведение КИ III фазы. При этом в нем были допущены ошибки, касающиеся статистического плана, включая обоснованность объема выборки. Эти недоработки заявителя привели к многостороннему замечанию, включающему рекомендации по выбору подходящей гипотезы, расчету допустимой границы не меньшей эффективности и, следовательно, объему выборки пациентов.

Необходимо помнить, что результаты КИ II фазы в некоторых случаях⁴⁷ могут быть достаточными для регистрации препарата. Если заявитель планирует, имея для этого аргументированное основание, формировать регистрационное досье препарата, располагая результатами только КИ II фазы, необходимо предусмотреть изучение преимуществ предлагаемого ЛП на обоснованном количестве пациентов с возможностью использования результатов внешнего контроля и применение процедуры условной регистрации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К программе КИ РФЛП применимы как общие требования к проведению КИ других групп лекарственных средств, так и дополнительные

элементы изучения, связанные с особыми свойствами данных препаратов – их радиоактивностью. Методологические подходы руководств ведущих регуляторных агентств могут быть использованы при подготовке отечественного руководства (рекомендаций) по планированию, проведению и оценке результатов КИ РФЛП. При планировании программы КИ конкретного препарата разработчикам РФЛП также необходимо учитывать все особенности и характеристики, присущие данному препарату, в том числе степень инновационности, показания к применению, тип связанного с радионуклидом лиганда, уровень радиационной активности.

По результатам проведенного анализа можно сделать вывод, что существует потребность в разработке рекомендаций по клиническому изучению отдельно для диагностических и терапевтических РФЛП, несмотря на то что разработаны и действуют нормативные правовые акты ЕАЭС, подробно описывающие как общие алгоритмы разработки программ изучения ЛП и составления протоколов КИ ЛП, так и детализирующие проведение КИ в зависимости от типа ЛП и изучаемой нозологии.

Наиболее многочисленные и критичные замечания к проанализированным протоколам РФЛП касались программы клинической разработки, выбора популяции КИ и ее размера, выбора конечных точек КИ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sgouros G, Bodei L, McDevitt, MR, Nedrow JR. Radiopharmaceutical therapy in cancer: Clinical advances and challenges. *Nat Rev Drug Discovery*. 2020;19(9):589–608. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0073-9>
2. Косенко ВВ, Трапкова АА, Калмыков СН. Регулирование обращения радиофармацевтических препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(4):379–88. Kosenko VV, Trapkova AA, Kalmykov SN. Regulation of radiopharmaceutical products. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(4):379–88 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-4-379-388>
3. Eberlein U, Cremonesi M, Lassmann M. Individualized dosimetry for theranostics: Necessary, nice to have, or counterproductive? *J Nucl Med*. 2017;58(Suppl 2):97S–103S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.186841>
4. Sundlöv A, Sjögreen-Gleisner K, Svensson J, Ljungberg M, Olsson T, Bernhardt P, Tennvall J. Individualised ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE treatment of neuroendocrine tumours based on kidney dosimetry. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2017;44(9):1480–9. <https://doi.org/10.1007/s00259-017-3678-4>
5. Степченкова ЕД, Тищенко ВК, Власова ОП, Петриев ВМ, Легкодимова НС, Крылов ВВ и др. Распределение активности в крови и моче пациентов, получающих системную терапию радиофармпрепаратом с ¹⁷⁷Lu и локальную (внутрисуставную) терапию радиофармпрепаратом с ¹⁸⁸Re. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(4):404–14. Stepchenkova ED, Tishchenko VK, Vlasova OP, Petriev VM, Legkodimova NS, Krylov VV, et al. Radioactivity distribution in the blood and urine of patients receiving systemic therapy with a ¹⁷⁷Lu radiopharmaceutical and local (intra-articular) therapy with a ¹⁸⁸Re radiopharmaceutical. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(4):404–14 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-4-404-414>
6. Горячев ДВ, Иванова ОЮ, Лыскова ИВ. Типичные ошибки при выборе критичных характеристик протоколов клинических исследований эффективности лекарственных средств. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2024;87(3):38–42. Goryachev DV, Ivanova OYu, Lysikova IV. Typical errors in selecting critical characteristics of the clinical trial protocol for assessing the drug efficacy. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2024;87(3):38–42 (In Russ.). <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2024-87-3-38-42>

⁴⁷ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: И.В. Лыскова, А.А. Черная, Д.Д. Кушнир — планирование и разработка дизайна исследования, сбор и систематизация данных литературы и руководящих документов, протоколов клинических исследований, проведение сравнительного анализа, обобщение результатов исследования, формулировка выводов; Д.В. Горячев, И.В. Лыскова — идея, планирование исследования, ответственность за все аспекты работы, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Irina V. Lysikova, Anastasiia A. Chernaia, and Daria D. Kushnir* planned and designed the study, collected and collated data from the literature, regulations, and clinical trial protocols, conducted the comparative analysis, summarised the results of this study, and formulated the conclusions. *Dmitriy V. Goryachev and Irina V. Lysikova* conceived the study idea, planned the study, agreed to be accountable for all aspects of the work, and approved the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Горячев Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук / **Dmitriy V. Goryachev**, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8583-2372>

Лыскова Ирина Викторовна, канд. мед. наук / **Irina V. Lysikova**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7032-5957>

Черная Анастасия Андреевна / **Anastasiia A. Chernaia**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-5074-9445>

Кушнир Дарья Дмитриевна / **Daria D. Kushnir**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-4433-2870>

Поступила 28.11.2024

После доработки 16.01.2025

Принята к публикации 11.02.2025

Received 28 November 2024

Revised 16 January 2025

Accepted 11 February 2025



ФГБУ «НЦЭСМП» МИНЗДРАВА РОССИИ

ЦЕНТР ТРАНСФЕРА МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

В ЦЕЛЯХ ЗАЩИТЫ И ПРОДВИЖЕНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ РАЗРАБОТОК ПРЕДЛАГАЕМ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ И СОПРОВОЖДЕНИЕ



ПО НАПРАВЛЕНИЮ МЕДИЦИНСКИЕ ИЗДЕЛИЯ

РЕГИСТРАЦИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

- По всем видам процедур: национальная, ЕАЭС, ускоренные

РАЗРАБОТКА КОНСТРУКТОРСКИХ, ТЕХНИЧЕСКИХ, ЭКСПЛУАТАЦИОННЫХ И СОПРОВОДИТЕЛЬНЫХ ДОКУМЕНТОВ

КОНСУЛЬТАЦИОННЫЕ УСЛУГИ В СФЕРЕ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

- Классификация
- Регистрация
- Сертификация
- Продвижение и мониторинг медицинского изделия



ПО НАПРАВЛЕНИЮ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

ПАТЕНТНО-АНАЛИТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

- Проведение патентных исследований
- Разработка стратегии правовой охраны готового медицинского продукта
- Анализ ЛНА в области ИС

РЕГИСТРАЦИЯ ОБЪЕКТОВ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ В РОССИИ И ЗА РУБЕЖОМ

- Подготовка и подача заявки на получение охранного документа на изобретение, товарный знак, программу для ЭВМ и другие объекты ИС
- Подготовка и подача международной (РСТ)/евразийской заявки на изобретение
- Внесение программы для ЭВМ в реестр отечественного ПО
- Сопровождение делопроизводства по заявкам

ПОИСК И СОДЕЙСТВИЕ В ОРГАНИЗАЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ ПАРТНЕРАМИ

АНАЛИТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

- Мета-анализ литературы
- Маркетинговый анализ востребованности разрабатываемого медицинского изделия на рынке

СОЗДАНИЕ БИЗНЕС-ПЛАНА И МОДЕЛИ КОММЕРЦИАЛИЗАЦИИ НАУЧНОЙ РАЗРАБОТКИ

КОНСУЛЬТАЦИОННЫЕ УСЛУГИ ПО РАЗРАБОТКЕ СМК, СТРАТЕГИЙ И РАЗДЕЛОВ СТРАТЕГИЧЕСКОГО ПЛАНА

СПОРЫ, СВЯЗАННЫЕ С ОХРАНОЙ И ЗАЩИТОЙ ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

- Подготовка претензии о нарушении прав
- Представление интересов в палате по патентным спорам

ЮРИДИЧЕСКОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ ТРАНСФЕРА МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

- Анализ рисков, связанных с ИС
- Разработка пакета документов (соглашение о неразглашении конфиденциальной информации, договоры о распоряжении правом, соглашения с авторами)
- Сопровождение устных и письменных переговоров

Полный перечень услуг Центра трансфера медицинских технологий представлен на сайте ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России <https://www.regmed.ru/produkt-n-service/t-m-t/>

✉ Центр трансфера медицинских технологий; ctmt@expmed.ru



**Регуляторные исследования
и экспертиза лекарственных средств**

