

Том 15, № 3 2025
Vol. 15, No. 3

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

Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств



Regulatory research and medicine evaluation

ГЛАВНАЯ ТЕМА

Доклинические исследования: курс на трансляционность

www.vedomostincesmp.ru

QR-гид: документы в мгновенном доступе

Нормативно-правовые акты

Доклинические исследования: курс на трансляционность



Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.



ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики



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



ГОСТ Р ИСО 9000-2015. Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь



Федеральный закон Российской Федерации от 30.03.1999 № 52 «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»



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



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



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



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



СП 2.1.3678-20. Санитарно-эпидемиологические требования к эксплуатации помещений, зданий, сооружений, оборудования и транспорта, а также условиям деятельности хозяйствующих субъектов, осуществляющих продажу товаров, выполнение работ или оказание услуг

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!

Одной из начальных стадий разработки лекарственных средств являются доклинические исследования. От качества их проведения и надежности полученных результатов зависит успешность проведения дальнейших стадий разработки и ввод в гражданский оборот новых лекарственных препаратов, столь необходимых сегодня в условиях импортозамещения.

Выбор главной темы выпуска «Доклинические исследования: курс на трансляционность» — далеко не случаен. Данные, полученные *in vitro* и *in vivo*, далее транслируются на стадию клинических исследований, и чем точнее и корректнее проведены исследования в пробирке или на животных, тем успешнее

и безопаснее будут исследования в человеческой популяции. Завершающим этапом проведенного научного исследования является обнародование, то есть опубликование полученных данных. В этом ключе немаловажным аспектом является не только высокое качество самих данных, полученных в результате проведенных исследований, но и корректность и полнота их представления в публикациях.

В данном выпуске журнала представлены статьи, освещающие различную проблематику доклинических исследований — особенности менеджмента их планирования и проведения по требованиям ЕАЭС, конкретные методологические аспекты исследований по токсикологии и фармакодинамике, вопросы разработки и валидации методик исследования, а также результаты некоторых доклинических исследований новых субстанций и лекарственных растительных препаратов.

Все статьи отражают высокую степень важности качества проведения доклинических исследований и представляют практические рекомендации для выполнения максимально продуманных с точки зрения дизайна исследований с получением надежных результатов.

*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:

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук

Научный редактор:

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, издателя 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

www.vedomostincesmp.ru

Журнал основан в 1999 году.

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

Выходит шесть раз в год.

Журнал открытого доступа, индексируется в российских и международных реферативных и индексных базах данных: Chemical Abstracts (CAS), Embase, Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), Russian Science Citation Index (RSCI), RUSMED, его архив включен в базы крупнейших агрегаторов научных ресурсов и библиотек WorldCat, DOAJ, Российская государственная библиотека, Академия Google (Google Scholar), КиберЛенинка, BASE, Dimensions, Open Archives Initiative, ResearchBib, ЭБС 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 рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (категория К1).

В журнале освещаются передовые достижения в сфере стандартизации и оценки качества лекарственных препаратов различных групп, разработки и совершенствования методик фармацевтического анализа, методологии экспертизы лекарственных средств, в том числе по установлению их взаимозаменяемости, обсуждаются новые высокотехнологические методы доклинических и клинических исследований лекарственных средств, рассматриваются актуальные проблемы фармакологии, клинической медицины, вопросы рационального применения лекарственных препаратов на основе принципов персонализированной терапии.

К публикации в журнале принимаются обзорные и оригинальные статьи, методические материалы, тематика которых соответствует медицинскому, фармацевтическому и химическому отраслям науки и следующим научным специальностям:

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

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

Подписано в печать:	30.06.2025
Дата выхода в свет	11.07.2025
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, акад. 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, акад. 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 Сьюзан, Ph.D. (Бонн, Германия)

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

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

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

Science Editor:

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, publisher, 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, 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:	30.06.2025
Date of publication:	11.07.2025
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)

Natalya 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, Academician 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, №3 2025

ГЛАВНАЯ ТЕМА:		ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ: КУРС НА ТРАНСЛЯЦИОННОСТЬ
<i>М.М. Галагудза</i>	248	Трансляционный кризис биомедицинских разработок: анализ причин и пути преодоления
<i>С.В. Ходько, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров</i>	252	Документальное сопровождение доклинического исследования <i>in vivo</i> в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики
<i>К.Л. Крышень, Я.А. Гуцин, Н.М. Фаустова, С.В. Гуцина, Ж.Ю. Устенко, А.Е. Кательникова, К.Т. Султанова, А.А. Матичин, В.А. Вавилова, Я.Г. Муразов, М.В. Мирошников, М.А. Ковалева, Д.В. Шубин, В.Г. Макаров, М.Н. Макарова</i>	262	Интерпретация данных токсикологических исследований лекарственных средств при определении дозы, не вызывающей видимых нежелательных эффектов (NOAEL)
<i>Н.М. Фаустова, А.Е. Салопопова, М.В. Мирошников, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров</i>	278	Оценка функционального состояния органов кроветворения в токсикологических исследованиях лекарственных препаратов: обзор. Часть 1. Органы кроветворения лабораторных животных. Механизмы развития гематотоксичности
<i>М.Л. Васютина, К.В. Лепик, М.С. Истомина, К.А. Левчук, А.В. Петухов, Е.В. Щелина, А.Е. Ершова, О.Н. Демидов, Я.Г. Торопова</i>	289	Методы доклинической оценки эффективности противоопухолевых лекарственных средств <i>in vivo</i> (обзор)
<i>И.И. Яичков, А.Л. Хохлов, М.К. Корсаков, Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов, О.Э. Лазаряни, А.В. Коровина</i>	301	Изучение распределения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов на крысах
<i>О.В. Мушкина, Н.С. Гурина</i>	313	Комплексная оценка противовоспалительного действия водных извлечений и гелей на основе листьев ольхи черной и ольхи серой <i>in vivo</i>
		РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК
<i>С.И. Кулешова, М.Л. Горюнова, О.Н. Высочанская</i>	322	Методы определения невидимых частиц в лекарственных средствах (обзор)
<i>О.А. Ваганова, Р.С. Смирнов, С.А. Ленин, К.С. Фунташев, А.А. Костромских, А.С. Перегудова, Д.А. Кадыкова, В.А. Меркулов</i>	330	Моноклональные антитела: разработка платформенных методик оценки примесей высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений
<i>Е.О. Чечетова, Н.П. Неугодова, О.В. Шаповалова</i>	347	Метод определения пирогенности с использованием моноцитов: перспективы и особенности применения (обзор)
		ЛЕКАРСТВЕННОЕ РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ
<i>О.В. Евдокимова, А.С. Алексеева</i>	357	Новые виды лекарственного растительного сырья в российской фармакопее: номенклатура и требования к качеству (обзор)

Contents

Volume 15, No. 3 2025

MAIN TOPIC:		PRECLINICAL TRIALS: A COURSE TOWARDS TRANSLATIONALITY
<i>M.M. Galagudza</i>	248	Translational Crisis in Biomedical Research: Analysis of Causes and Ways to Overcome It
<i>S.V. Khodko, M.N. Makarova, V.G. Makarov</i>	252	Documentary Support for Preclinical Studies <i>in vivo</i> in Accordance with the Principles of Good Laboratory Practice
<i>K.L. Kryshen, Ya.A. Gushchin, N.M. Faustova, S.V. Gushchina, Zh.Yu. Ustenko, A.E. Katelnikova, K.T. Sultanova, A.A. Matichin, V.A. Vavilova, Ia.G. Murazov, M.V. Miroshnikov, M.A. Kovaleva, D.V. Shubin, V.G. Makarov, M.N. Makarova</i>	262	Interpretation of Toxicological Research Data in Establishing the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) for Medicinal Products
<i>N.M. Faustova, A.E. Saloponova, M.V. Miroshnikov, M.N. Makarova, V.G. Makarov</i>	278	Assessment of Functional Safety of Blood Forming Organs in Research of Toxicological Properties of Medicinal Products (Review). Part 1. Features of the Hematopoietic Organs of Laboratory Animals. Mechanisms of Hematototoxicity
<i>M.L. Vasyutina, K.V. Lepik, M.S. Istomina, K.A. Levchuk, A.V. Petukhov, E.V. Shchelina, A.E. Ershova, O.N. Demidov, Ya.G. Toropova</i>	289	Methods for Preclinical Assessment of the Efficacy of Anticancer Medicines <i>in vivo</i> (Review)
<i>I.I. Yaichkov, A.L. Khokhlov, M.K. Korsakov, N.N. Volkhin, S.S. Petukhov, O.E. Lazariants, A.V. Korovina</i>	301	Distribution Study of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and Its Metabolites in Rats
<i>O.V. Mushkina, N.S. Gurina</i>	313	Integrated Assessment of the Anti-Inflammatory Effect <i>in Vivo</i> of Aqueous Extracts and Gels Based on Black Alder and Gray Alder Leaves
		DEVELOPMENT AND VALIDATION OF RESEARCH METHODS
<i>S.I. Kuleshova, M.L. Goryunova, O.N. Vysochanskaya</i>	322	Methods for Detecting Subvisible Particles in Medicines (Review)
<i>O.A. Vaganova, R.S. Smirnov, S.A. Lenin, K.S. Funtashev, A.A. Kostromskih, A.S. Peregodova, D.A. Kadykova, V.A. Merkulov</i>	330	Monoclonal Antibodies: Development of Universal (Platform) Methods for the Assessment of High and Low-molecular Weight Impurities
<i>E.O. Chechetova, N.P. Neugodova, O.V. Shapovalova</i>	347	Method for Determining Pyrogenicity Using Monocytes: Prospects and Features of Application (Review)
		HERBAL RAW MATERIAL
<i>O.V. Evdokimova, A.S. Alekseeva</i>	357	New Species of Herbal Medicines in the Russian Pharmacopoeia: Nomenclature and Quality Requirements (Review)



Михаил ГАЛАГУДЗА:
«Коэффициент транслируемости новых разработок становится выше»

Mikhail GALAGUDZA:
‘Translatability coefficient for new research developments’

М.М. Галагудза

Трансляционный кризис биомедицинских разработок: анализ причин и пути преодоления

*Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, 197341, Российская Федерация*

✉ **Галагудза Михаил Михайлович;** galagudza@almazovcentre.ru

РЕЗЮМЕ

Понятие трансляционного разрыва заключается в том, что интенсивное развитие фундаментальных биомедицинских исследований на рубеже XX и XXI вв. до последнего времени не сопровождалось пропорциональным увеличением количества инновационных лекарственных препаратов, а также диагностических и лечебных технологий, нашедших применение в клинической практике. Своими мыслями о причинах трансляционного кризиса и путях выхода из него делится директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН Михаил Михайлович Галагудза.

Ключевые слова: биомедицина; разработки; трансляционные исследования; трансляционный кризис; воспроизводимость данных; доклинические исследования

Для цитирования: Галагудза М.М. Трансляционный кризис биомедицинских разработок: анализ причин и пути преодоления. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2025;15(3):248–251. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-248-251>

Mikhail M. Galagudza

Translational Crisis in Biomedical Research: Analysis of Causes and Ways to Overcome It

National Medical Research Center named after V.A. Almazov,
2 Akkuratova St., St. Petersburg 197341, Russian Federation

✉ **Mikhail M. Galagudza**; galagudza@almazovcentre.ru

ABSTRACT

The concept of translational gap implies that the intensive development of basic biomedical research at the turn of the 20th and 21st centuries has not, until recently, been accompanied by a proportional increase in the number of innovative drugs, as well as diagnostic and therapeutic technologies that have found application in clinical practice. Mikhail M. Galagudza, Director of the Institute of Experimental Medicine at the Almazov National Medical Research Center of the Russian Ministry of Healthcare, Doctor of Medical Sciences, Professor and Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, shares his thoughts on the causes of the translational crisis and ways of its resolution.

Keywords: biomedicine; development; translational research; translational crisis; data reproducibility; preclinical studies

For citation: Galagudza M.M. Translational crisis in biomedical research: Analysis of causes and ways to overcome it. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(3):248–251. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-248-251>

Несмотря на значительные успехи теоретических биомедицинских дисциплин, степень внедрения имеющихся разработок в практическое здравоохранение остается крайне низкой. В проведение фундаментальных исследований, направленных на понимание механизмов развития заболеваний, были вложены огромные материальные ресурсы. Тем не менее эти вложения не привели к пропорциональному приросту количества новых методов лечения, диагностических систем и превентивных программ – произошел так называемый трансляционный кризис. На сегодняшний день известно, что только один из 20 препаратов для лечения злокачественных новообразований, которые были допущены до клинических исследований, получает разрешение на применение в клинике. С целью повышения эффективности внедрения инновационных разработок в практическую медицину на рубеже веков появилось новое научное направление, призванное сократить и в идеале ликвидировать существующий разрыв между научными изобретениями и повседневной медицинской практикой. Это направление получило название трансляционной медицины.

– Михаил Михайлович, как вы считаете, «кризис трансляционности» продолжает оставаться актуальной проблемой современных доклинических исследований?

Основным объективным показателем, который служил для оценки степени выраженности трансляционного кризиса, всегда являлась динамика количества одобренных для клинического

применения новых лекарственных средств. Традиционно использовалась статистика одобрения инновационных препаратов американского FDA, причем в некоторых расчетах количество препаратов приводилось к затратам на исследования и разработки. В этом плане ситуация начала 2000-х годов могла показаться неутешительной, поскольку в 2000–2010 гг. ежегодно выходили на рынок в среднем 20 новых препаратов. При этом аналогичные средние цифры были характерны для 80–90-х годов XX в., хотя в некоторые годы и происходили необычные всплески. Так, в 1996 г. были одобрены 53 препарата. Что же происходит в последние 5 лет? Отмечается четкая тенденция к увеличению количества одобренных препаратов: в 2020, 2021, 2022, 2023 и 2024 гг. – 53, 50, 37, 55 и 50 соответственно. Еще одна важная тенденция – общее увеличение количества одобренных препаратов в значительной степени обусловлено биологическими препаратами, доля которых составляет в среднем 20%. Таким образом, в последние годы появляется повод для осторожного оптимизма в отношении того, что «коэффициент транслируемости» новых разработок становится выше. Следует отметить, что существуют и другие подходы к оценке ситуации в области трансляционных исследований, некоторые из которых свидетельствуют о сохранении и даже углублении кризиса. Так, например, в мире постоянно увеличивается количество научных публикаций, но их среднее качество, которое главным образом определяется воспроизводимостью публикуемых данных, оставляет желать лучшего.

– Какие, по вашему мнению, основные причины кризиса трансляционности?

Анализ сложившейся ситуации в общемировом масштабе показывает, что в основе проблемы лежит наличие так называемых трансляционных барьеров, которые включают:

- недостаточность контактов между учеными и врачами-клиницистами;
- проблематичность экстраполяции данных, полученных на животных, на клиническую ситуацию;
- ошибочный дизайн клинических исследований новых лекарственных препаратов;
- малые объемы финансирования для продвижения инновационных продуктов и организации их производства;
- инертность мышления специалистов практического здравоохранения;
- нежелание инвесторов вкладывать средства в проекты с длительным сроком возврата инвестиций.

Если мы сосредоточимся на проблеме использования животных в экспериментальных и доклинических исследованиях, то, более прицельно, можно рассмотреть следующие источники низкой трансляции данных в практику:

- видовые особенности лабораторных животных, не позволяющие успешно переносить полученные данные на клиническую практику;
- степень соответствия экспериментальных моделей патологических процессов ситуациям, имеющим место в клинической практике у пациентов;
- некорректное статистическое обоснование размера выборки и неоптимальные подходы к анализу первичных данных;
- «рафинированность» выборки лабораторных животных, позволяющая максимально увеличить внутреннюю валидность эксперимента, но снижающая внешнюю валидность;
- систематические ошибки, связанные с организацией и проведением экспериментальных исследований.

– Можно ли основной причиной считать недостатки организации современных научных исследований?

Организация проведения экспериментальных исследований на животных — безусловно, одна из важнейших причин низкой воспроизводимости получаемых данных, а следовательно, и их низкой транслируемости, поскольку невозможные для воспроизведения данные не подлежат трансляции. Согласно современным данным, отсутствие воспроизводимости результатов экспериментов отмечается в 51–89% случаев. Исследователи Bayer Healthcare смогли воспроизвести только 20–25%

из 67 преclinical исследований, а исследователи Amgen воспроизвели только 6 из 53 исследований в области биологии рака во взаимодействии с авторами-исследователями.

При этом наиболее часто на валидность эксперимента влияют 4 типа систематических ошибок: ошибки отбора; ошибки, связанные с отсевом; ошибки, связанные с ходом исследования; ошибки детекции. Основное отличие систематической ошибки от случайной ошибки состоит в том, что систематические ошибки не могут быть устранены за счет увеличения размера выборки.

Ошибки отбора возникают в том случае, когда между группами животных имеются значимые исходные различия. Ошибки, связанные с выполнением исследования, возникают в том случае, когда животные разных групп содержатся в неодинаковых условиях, получают неодинаковый уход или подвергаются воздействию факторов, отличающихся от тестируемого воздействия. Ошибки детекции возникают при неодинаковом подходе к оценке исходов исследования. Лица, оценивающие исходы, должны быть маскированы относительно принадлежности животных к той или иной группе. Ошибки отсева возникают при неодинаковых подходах к исключению животных из экспериментальных групп. Основными способами устранения систематических ошибок являются рандомизация, сокрытие порядка отнесения животного к той или иной группе, маскирование воздействия (ослепление). Фактически речь идет о возможности проведения доклинических исследований в соответствии с принципами доказательной медицины. По-видимому, внедрение принципов доказательной медицины (многоцентровой характер, ослепление, рандомизация, доступ к первичным данным) в преclinical сферу является мощным инструментом для повышения воспроизводимости исследований и увеличения успеха трансляции.

– Каков, по вашему мнению, вклад в трансляционный кризис качества животных?

Понятие качества животных включает три компонента: 1) генетический статус; 2) микробиологический статус; 3) стандартизированные условия содержания. Многие десятилетия усилия исследователей были направлены на максимальную стандартизацию всех компонентов качества животных. Стимулами для жесткой стандартизации служили этические и экономические факторы. Потенциально стандартизация минимизирует внешние и внутренние источники вариативности получаемых данных, связанные с тест-системой. Следовательно, на стандартизированных животных можно получить данные с минимальным стандартным отклонением.

Поскольку стандартное отклонение первичной конечной точки пропорционально размеру выборки, использование стандартизированных животных приводит к уменьшению размера выборки и, с другой стороны, может способствовать выявлению слабых эффектов. На определенном этапе развития науки эти преимущества оказались определяющими, и исследователи предпочитали использовать линейных животных SPF категории, содержащихся в строго контролируемых условиях. Но было ли оправдано использование таких животных с точки зрения вероятности трансляции в клиническую практику? Наиболее вероятно — нет, поскольку пациенты в реальной клинической практике имеют широкое распределение генотипов и фенотипов, что увеличивает вариабельность ответа на терапию, а в некоторых случаях может и в целом снижать эффективность терапии. Оба фактора приводят к тому, что воздействие с доказанной в «идеализированном» эксперименте эффективностью (пограничной, но статистически значимой) оказывается неэффективным в клинических исследованиях.

Поэтому в последнее время наблюдается «обратный тренд», связанный с критикой использования SPF животных в большинстве доклинических исследований. Действительно, иммунная система SPF животных воспроизводит иммунную систему новорожденного ребенка, но не взрослого человека. Это находит отражение и в ходе моделирования патологических процессов. Так, у животных SPF категории отмечаются более быстрое развитие злокачественных опухолей и их прогрессия, которые не являются репрезентативными с точки зрения клинической практики. В связи с этим вопрос об оптимальном качестве животных для определенных видов исследований является открытым и требует тщательной проработки. Для одного вида исследований наилучшим образом подойдут аксенные (безмикробные) животные, а для другого — животные из конвенциональной колонии.

– Какие пути выхода из кризиса вы видите?

В последние годы возникают принципиально новые подходы, некоторые из них со временем могут способствовать выходу из трансляционного кризиса.

Первое — это все более широкое использование органоидов и органов-на-чипе в доклинических исследованиях. Поскольку для построения подобных *ex vivo* систем используются стволовые клетки человека, мы фактически получаем возможность тестировать эффективность и безопасность новых лекарственных препаратов на клиническом материале. С учетом использования

клеток, полученных от пациентов, например со злокачественными новообразованиями, дополнительным преимуществом становится персонализация подходов.

Второе — применение технологий искусственного интеллекта (ИИ) в процессе разработки лекарственных средств. Последние достижения в области ИИ, включая распознавание образов, обработку текстов на естественном языке и компьютерное зрение, являются особенно перспективными инструментами для решения важнейших проблем разработки лекарств. ИИ находит применение при анализе сложных биологических систем, идентификации биомаркеров заболеваний и мишеней действия лекарственных средств, моделировании взаимодействия лиганда и рецептора, предикции безопасности и эффективности кандидатных молекул, а также в построении оптимального дизайна клинических исследований.

Третье — трансляционный разрыв преодолевается не только со стороны фундаментальных разработок, но и со стороны клинических испытаний. В последние годы наблюдается переоценка значимости данных так называемой реальной клинической практики (RWD) и доказательств, основанных на их анализе (RWE). Традиционные клинические исследования отвечают на вопрос «Может ли лекарство в принципе оказать лечебный эффект?», тогда как наблюдательные исследования реальной клинической практики больше сосредоточены на вопросе «Как часто достигается лечебный эффект, насколько он выражен и чем определяется эффективность/неэффективность?».

Разумеется, наблюдательные исследования не способны заменить рандомизированные клинические исследования (РКИ), но их данные предоставляют неоценимую информацию в тех случаях, когда проведение РКИ нецелесообразно вследствие низкой распространенности заболевания или его подтипа. В целом, постоянно увеличивается роль пациента в процессе разработки лекарств. Пациент сегодня — это не просто конечный потребитель технологии, а активный участник ее разработки и совершенствования. Эти инновации не отменяют прежних «рецептов» по борьбе с кризисом трансляруемости, а именно, подготовки врачей-исследователей, создания междисциплинарных трансляционных команд, обязательного использования систематических обзоров и метаанализов, повышения воспроизводимости экспериментальных и доклинических исследований, следования специфическим для определенных научных областей стандартам (например, рекомендациям STAIR в нейропротекции) и т.п.



С.В. Ходько 
М.Н. Макарова 
В.Г. Макаров 

Документальное сопровождение доклинического исследования *in vivo* в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики

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

✉ Ходько Светлана Владимировна; khodko.sv@doclinika.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В Евразийском экономическом союзе (ЕАЭС) в настоящее время отсутствуют руководства по ведению документооборота при доклинических исследованиях (ДКИ). При этом надлежащая регистрация первичных данных необходима для подтверждения качества полученных результатов исследования.

ЦЕЛЬ. Представление одного из возможных вариантов документированного сопровождения доклинического исследования от составления запроса на его выполнение до формирования итогового отчета с дальнейшим переносом данных в регистрационное досье на лекарственное средство.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе использован информационно-аналитический метод исследования. Все рекомендации по документированию ДКИ даны в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики ЕАЭС в сфере обращения лекарственных средств, регламентирующими деятельность испытательных центров, выполняющих ДКИ с использованием экспериментальных животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Установлено, что общих рекомендаций ЕАЭС по проведению исследований с использованием экспериментальных животных недостаточно для проведения ДКИ надлежащего качества. Предложен один из возможных вариантов полного документирования ДКИ. Показано соответствие предложенных документов Правилам ЕАЭС по всем этапам исследования. Отмечено, что каждый испытательный центр в рамках собственной системы менеджмента качества должен учитывать особенности конкретного исследования при разработке необходимых форм и документов. Создание того или иного документа должно обеспечивать соблюдение принципов надлежащей лабораторной практики и гарантировать полноту и сохранность информации, полученной в исследовании.

ВЫВОДЫ. Предложенный вариант документооборота может быть использован испытательными центрами при планировании и проведении ДКИ в соответствии с регуляторными требованиями, предъявляемыми к деятельности руководителя исследования и к правилам проведения инспекций со стороны службы качества.

Ключевые слова: доклинические исследования; документирование; надлежащая лабораторная практика; Good Laboratory Practice; GLP; рекомендации ЕАЭС

Для цитирования: Ходько С.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Документальное сопровождение доклинического исследования *in vivo* в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(3):252–261. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-698>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

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

Svetlana V. Khodko ✉ 
 Marina N. Makarova 
 Valery G. Makarov 

Documentary Support for Preclinical Studies *in vivo* in Accordance with the Principles of Good Laboratory Practice

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

✉ Svetlana V. Khodko; khodko.sv@doclinika.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Currently, the Eurasian Economic Union (EAEU) lacks guidelines for documenting preclinical studies. At the same time, proper registration of raw data is necessary to confirm the quality of the preclinical results obtained.

AIM. This study aimed at introducing a documentation procedure for preclinical studies that would cover documents from the initial study application to the final report and provide for preclinical data transfer to the marketing authorisation dossier.

MATERIALS AND METHODS. The authors opted for information analysis as the method of research. All recommendations for documenting preclinical studies were formulated in accordance with the EAEU Good Laboratory Practice (GLP) requirements applicable to the medicinal product lifecycle and the work of preclinical study sites using experimental animals.

RESULTS. The general EAEU recommendations for the conduct of animal studies are not sufficient to achieve adequate quality of preclinical studies. This article proposes a procedure for complete documentation of preclinical studies, with all documents following the documentation requirements of the EAEU GLP for each study stage. When developing the necessary forms and documents, each study site should operate under its own quality management system and consider the preclinical study specifics on a case-by-case basis. The preparation of any given document should ensure compliance with the GLP principles and guarantee the completeness and integrity of the data obtained.

CONCLUSIONS. Study sites can implement the proposed documentation procedure to design and conduct preclinical studies in accordance with the regulatory requirements that determine the role and responsibilities of the study director and the conduct of inspections by the quality assurance unit.

Keywords: preclinical studies; documentation; Good Laboratory Practice; GLP; EAEU guidelines

For citation: Khodko S.V., Makarova M.N., Makarov V.G. Documentary support for preclinical studies *in vivo* in accordance with the principles of Good Laboratory Practice. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(3):252–261. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-698>

Funding. The study was performed without external funding.

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

ВВЕДЕНИЕ

Требования к организации и проведению доклинических исследований (ДКИ) лекарственных средств изложены в соответствующих нормативных документах¹, однако доступной литературы и руководств о порядке документирования всех процедур при выполнении ДКИ на практике не представлено.

Применение неудовлетворительных стандартов при планировании, проведении и составлении

отчетов по биомедицинским исследованиям, включая эксперименты на животных, приводит к получению ошибочных данных [1, 2]. Несколько инициативных групп специалистов поставили цель повысить достоверность и воспроизводимость результатов исследований [3–10]. Рекомендации в различных руководствах по ДКИ схожи, но отличаются детализацией изложения, строгостью требований и объемом необходимых исследований [11, 12], и лишь

¹ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

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

немногие из них охватывают тщательное планирование и проведение исследований на животных [5, 13]. Результатом работы стала разработка рекомендаций, включающих пять основных разделов: первые три относятся к планированию эксперимента, четвертый – к проведению и пятый – к документации и отчетности [14].

Руководства ARRIVE² (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments) [15] или PREPARE³ (Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence) содержат рекомендации по изложению методов и результатов экспериментов на животных таким образом, чтобы эти результаты были контролируемыми и воспроизводимыми. В 2024 г. Европейской комиссией опубликовано руководство Promoting Reusable and Open Methods and Protocols (PRO-MaP) [16], которое ориентировано на четыре группы заинтересованных лиц: исследователи, администрации испытательных центров, редакции научных изданий и спонсоры. Документ описывает желаемые действия со стороны каждой из этих групп участников исследования для того, чтобы результаты и методы работы с животными были доступны для воспроизведения.

Общепризнанным фактом является невозможность предусмотреть абсолютно все, что может повлиять на результаты исследования, и заранее избежать всех рисков. Именно поэтому крайне важно иметь в процессе исследования исчерпывающую документацию.

Цель работы – представление одного из возможных вариантов документированного сопровождения доклинического исследования от составления запроса на его выполнение до формирования итогового отчета с дальнейшим переносом данных в регистрационное досье на лекарственное средство.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован информационно-аналитический метод исследования. Все рекомендации по документированию ДКИ даны в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств⁴ (Правила ЕАЭС), регламентирующими деятельность испытательных центров, выполняющих ДКИ с использованием экспериментальных животных. В Правилах ЕАЭС помимо общих рекомендаций сделаны некоторые акценты

на сопроводительной документации для отдельных этапов исследования, однако для применения на практике этой информации недостаточно. В предлагаемом нами варианте документирования ДКИ указаны номера конкретных пунктов Правил ЕАЭС, для реализации которых предусмотрен тот или иной документ.

Создание каждого документа в процессе ДКИ должно обеспечивать соблюдение принципов надлежащей лабораторной практики и гарантировать полноту и сохранность научной информации, составляющей суть исследования. При этом каждый испытательный центр в ходе разработки конкретных форм и документов должен учитывать правила внутренней системы менеджмента качества.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Начало исследования

Порядок документирования начала исследования не отражен в нормативных документах, действующих в настоящее время на территории России и ЕАЭС.

Для проведения ДКИ используют финансирование по грантам, заключают государственные контракты, исследования могут быть инициативными, т.е. выполняться испытательным центром или фармацевтической компанией за счет собственных средств, но чаще всего данный вид исследований является контрактным. Таким образом, основанием для начала ДКИ может являться заявка, заполненная спонсором исследования. Данный документ должен быть составлен таким образом, чтобы испытательный центр мог сформировать научно аргументированное коммерческое предложение и обосновать объем выборки тест-систем и количество объектов, необходимых для выполнения исследования.

Затем коммерческое предложение необходимо согласовать с руководителем испытательного центра и с экономической службой для составления сметы расходов, закупки тест-систем, материально-технического оснащения и т.д. Это позволит испытательному центру убедиться в собственной готовности к проведению исследования и избежать разногласий со спонсором в последующей работе. Однако для сотрудников испытательного центра необходимо будет дополнительное обучение по ведению документации и взаимодействию со спонсором исследования, так как предлагаемый подход требует

² <https://arriveguidelines.org/>

³ <https://norecopa.no/prepare/>

⁴ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

временных затрат на действие, которое изначально может казаться избыточным.

После согласования коммерческого предложения со спонсором оформляют договор, и руководитель испытательного центра издает приказ о назначении руководителя исследования⁵, который несет общую ответственность за проведение ДКИ и может подтвердить его соответствие принципам надлежащей лабораторной практики⁶ в рамках действующей системы менеджмента качества испытательного центра.

Подготовка к проведению экспериментальной части исследования

Проведение биоэтической комиссии (БЭК). Руководитель исследования подает заявку на проведение экспертизы проекта исследования и во время заседания комиссии докладывает о проекте исследования на основании технического задания (является обязательным приложением к договору) или на основании проекта плана исследования.

Как один из возможных вариантов, в ходе заседания БЭК руководитель исследования может устно согласовывать с руководителями подразделений, вовлеченных в проведение исследования, особенности предстоящей работы, используемые тест-системы, наличие достаточного количества материалов, оборудования, компетентных специалистов, возможные даты проведения экспериментальной части исследования и т.д.

Дополнительное обучение сотрудников (например, в случае, если отсутствует необходимая стандартная операционная процедура или требуется участие приглашенного специалиста) также обсуждается на заседании БЭК. Руководитель исследования обязан инициировать данный процесс обучения, так как именно он является лицом, заинтересованным в качестве проводимых в ходе ДКИ манипуляций.

После одобрения проекта исследования номер заключения БЭК используют как уникальный идентификационный код исследования⁷.

Очевидно, что вариант рассмотрения всех вопросов именно на заседании БЭК может быть организован в испытательных центрах по-разному, тем более что основной задачей БЭК является решение вопросов гуманного обращения с животными, тяжести проводимых процедур

и соблюдения принципов 3R. Присутствие специалистов разных структурных подразделений и разных компетенций помогает всесторонней оценке предлагаемого проекта исследования и планированию мероприятий по улучшению содержания животных в ходе исследования (особенно при моделировании тяжелых заболеваний).

Формирование рабочей группы. Тренинг по исследованию. Руководитель исследования формирует рабочую группу из сотрудников, задействованных в проведении исследования. В зависимости от количества вовлеченных в ДКИ подразделений или испытательных площадок рабочую группу можно сформировать на любом этапе подготовки исследования – с момента назначения руководителя исследования до начала экспериментальной части исследования. Состав рабочей группы зависит от дизайна исследования.

Для участников рабочей группы руководитель исследования проводит тренинг, на котором следует:

- обсудить критические фазы исследования и особенности его проведения, порядок регистрации данных, условия хранения и передачи биоматериала, специфику исследования;
- убедиться в том, что все сотрудники, вовлеченные в проведение исследования, обучены согласно внутренним нормативным документам, необходимым для реализации исследования.

Для каждого раздела работы определяется свой перечень внутренних нормативных документов, регламентирующих выполнение манипуляций и процедур, необходимых для реализации экспериментальной части исследования.

Бланк формирования рабочей группы должен быть подписан всеми сотрудниками, входящими в состав рабочей группы, и руководителем исследования. Все оформленные бланки формирования рабочей группы должны быть сохранены и переданы в архив в качестве приложения к итоговому отчету⁸.

Помимо того что формирование рабочей группы является фактически требованием регламентирующих стандартов, это чрезвычайно полезное мероприятие. Его невыполнение может повлечь за собой множество несоответствий, когда сотрудники не будут осознавать важность тех или иных манипуляций, не будут осведомлены

⁵ Там же, часть III, раздел 2 «Персонал испытательной лаборатории», п. 13.

⁶ Там же, часть III, раздел 2 «Персонал испытательной лаборатории», п. 14.

⁷ Там же, часть IV, раздел 3 «Проведение исследования», п. 58.

⁸ Там же, часть III, раздел 2 «Персонал испытательной лаборатории», п. 15.

об особенностях, например, введения исследуемых объектов животным или постоперационных манипуляций, или кто-либо из сотрудников окажется не обучен необходимым процедурам.

Обеспечение исследования товарно-материальными ценностями (ТМЦ). Необходимость приобретения ТМЦ (животных, лекарственных средств из аптечной сети и т.д.) также является зоной ответственности руководителя исследования. Руководитель исследования должен оформить необходимые заявки на получение животных, закупку ТМЦ и т.д. и затем отследить их выполнение смежными структурными подразделениями⁹.

Ответственность за обеспечение необходимыми ТМЦ для выполнения экспериментальной части исследования несет руководитель исследования, но данный вопрос должен быть рассмотрен на начальном этапе до заключения договора. Именно для этого составляется коммерческое предложение на основании заявки от спонсора.

Тестовая пробоподготовка. До начала введения исследуемых объектов экспериментальным животным руководитель исследования должен получить копии сопроводительных документов на исследуемые объекты, полученные от спонсора.

Вариант перечня необходимой сопроводительной документации:

- проект инструкции по медицинскому применению исследуемого объекта (если применимо);
- инструкция по безопасности при обращении с исследуемым объектом;
- сертификат анализа (паспорт качества) на конкретную серию исследуемого объекта;
- декларация о соответствии стандартного объекта (если применимо);
- акт приемки-передачи.

Руководитель исследования должен обеспечить проведение тестовой пробоподготовки¹⁰. Данной процедуре часто не уделяют должного внимания. При этом крайне редко при выполнении ДКИ есть возможность ввести экспериментальным животным лекарственное средство в готовой лекарственной форме. Чаще всего требуется приготовление готовых доз для введения,

а следовательно, подбор носителей, условий хранения, оценки стабильности приготовленных растворов и т.д.

По результатам тестовой пробоподготовки следует составить отчет, который будет являться инструкцией по подготовке готовых доз для введения. Это позволит гарантировать введение экспериментальным животным исследуемых объектов в необходимой дозе и допустимом объеме.

План исследования¹¹. После одобрения проекта исследования на заседании БЭК руководитель исследования оформляет план исследования, который должен быть проверен сотрудниками службы качества. Требование документировать данную проверку отсутствует в Правилах ЕАЭС, но указано в ГОСТ 33044-2014¹². При этом проверка плана исследования сотрудниками службы качества очень важна, так как именно по этому плану будет выполняться дальнейшая работа, и любые неточности могут привести к искажению или утрате первичных данных, к оформлению поправок и отклонений. Необходимо помнить о правиле: «если не записано, значит не сделано», поэтому проверку плана исследования на полноту и обоснованность каждого раздела, на соответствие договору и техническому заданию следует документировать.

После получения исследуемых объектов и при наличии необходимых тест-систем (как гарантии того, что для начала исследования есть все необходимое) руководитель исследования визирует план исследования своей датированной подписью, что является датой начала исследования. Оригинал плана исследования, подписанного всеми сторонами, в том числе спонсором исследования, хранится у руководителя исследования, по окончании исследования сдается в архив в качестве приложения к отчету. При необходимости оригинал плана исследования может быть передан в архив на временное хранение. В подразделения, вовлеченные в проведение исследования, передаются копии плана исследования.

План-график исследования¹³ – график работ по проведению экспериментальной части исследования, включающий в себя перечень

⁹ Там же, часть III, раздел 2 «Персонал испытательной лаборатории», п. 14.

¹⁰ Там же, часть III, раздел 6 «Испытуемые вещества (лекарственные средства) и образцы сравнения (контрольные образцы)», п. 41, 45, 46, 47.

¹¹ Там же, часть III, раздел 2 «Персонал испытательной лаборатории», п. 15.

¹² ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики.

¹³ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», часть III, раздел 2 «Персонал испытательной лаборатории», п. 15.

манипуляций и процедур в каждый день исследования. Не является обязательным документом согласно требованиям регламентирующих стандартов, но значимо облегчает работу, в которую вовлечены различные структурные подразделения, а также позволяет спонсору исследования планировать визиты для контроля выполнения конкретных манипуляций.

Руководитель исследования оформляет проект плана-графика, согласует точные даты проведения экспериментальной части исследования с руководителями вовлеченных подразделений, проверяет включение исследования в график их работы, а также предоставляет проект плана-графика сотрудникам, которые будут осуществлять приготовление доз исследуемых объектов для введения, и сотрудникам службы качества для планирования инспекции отдельного исследования.

Руководители подразделений, вовлеченных в проведение исследования, руководитель исследования и сотрудник службы качества визируют план-график датированной подписью.

Все оригиналы планов-графиков и дополнений к ним (при наличии) хранятся у руководителя исследования, после окончания исследования передаются в архив в качестве приложения к итоговому отчету. При необходимости оригинал плана-графика может быть передан в архив на временное хранение. В подразделения, вовлеченные в проведение исследования, передаются копии.

Распространение копий документов по исследованию¹⁴. После того как все документы, необходимые для начала экспериментальной части исследования (утвержденный план исследования и согласованный план-график), готовы, руководителю исследования следует передать их всем участникам рабочей группы и (или) руководителям структурных подразделений, а также сотрудникам службы качества. Если в испытательном центре есть система электронного документооборота или система типа LIMS (laboratory information management system), можно передать копии посредством данных систем, а можно в бумажном варианте, создав необходимое количество копий. В таком случае потребуется подтверждение, что все копии были получены, и с этой целью может быть оформлен лист передачи копий.

¹⁴ Там же.

¹⁵ Там же.

¹⁶ Там же, часть III, раздел 7 «Стандартные операционные процедуры», п. 49.

Проведение научно-исследовательской работы

Руководитель исследования обязан обеспечить соблюдение процедур, указанных в плане исследования, оценивать и документировать влияние любых отклонений от плана исследования на качество и достоверность результатов исследования, а также обеспечивать правильное документальное оформление и регистрацию ответственным персоналом всех полученных первичных данных¹⁵. Для реализации данного требования руководитель исследования в соответствии с критическими фазами каждого конкретного исследования составляет дневник руководителя исследования, отмечая в нем оценку ключевых манипуляций, даты их проведения, а также соответствие плану исследования, плану-графику и внутренней нормативной документации. Дневник руководителя исследования до окончания экспериментальной части исследования хранится у руководителя исследования и затем сдается в архив вместе с итоговым отчетом.

Перечень критических фаз исследования, которые обязан контролировать руководитель исследования [17]:

- формирование групп животных;
- регистрация массы тела животных;
- приготовление готовых доз исследуемых объектов для введения лабораторным животным;
- первое введение исследуемых объектов;
- клинический осмотр животных;
- клиническое наблюдение за животными;
- проведение физиологических тестов;
- взятие образцов биоматериала;
- индукция патологии;
- плановая/внеплановая эвтаназия;
- работа с биоматериалом в смежных подразделениях;
- другие процедуры в зависимости от дизайна исследования.

Первичные данные

Одним из важнейших требований соблюдения принципов надлежащей лабораторной практики является фиксация всех данных, полученных в ходе выполнения экспериментальной части исследования. Для заполнения первичных карт в испытательном центре должна быть разработана отдельная процедура¹⁶.

К данным, используемым в рамках правил надлежащих практик (GxP), предъявляют ряд

требований. Такие данные должны сопровождаться информацией об их происхождении, легко читаться, быть точными, являться оригинальными записями и регистрироваться своевременно. Совокупность этих базовых требований обозначают аббревиатурами ALCOA (прослеживаемость, читаемость, своевременность, подлинность и точность; *attributable, legible, contemporaneous, original, and accurate*) и ALCOA+ (дополнительно: полнота, последовательность, устойчивость и доступность данных, обозначенных в акрониме символом «+»; *complete, consistent, enduring, available*).

Информация о происхождении данных обеспечивается проставлением инициалов, полной рукописной подписи или личной печати исполнителя и (или) ответственного лица с указанием даты и, при необходимости, времени получения данных.

Для обеспечения читаемости, прослеживаемости и сохранности данных следует пользоваться устойчивыми несмываемыми чернилами, не использовать карандаши, не прибегать к стиранию записей ластиком, не закрывать надписи непрозрачной жидкостью, предназначенной для корректировки машинописных текстов. В этих же целях используют, например, прошитые журналы с пронумерованными страницами. Практикуется выпуск заполняемых форм с нанесенным порядковым номером. Архивирование бумажной документации поручается специально обученному персоналу.

Данные должны быть точными и являться оригинальными записями. Оригинальными считаются все первичные данные, полученные при исходной регистрации информации, и все последующие данные, необходимые для реконструкции действий, относящихся к правилам GxP. Важнейшим требованием к оригинальным данным является необходимость их оценки и скрепления подписью. Оригинальные данные должны быть полными и легко извлекаться из мест хранения. Письменные процедуры по рассмотрению и оценке данных должны разъяснять значение этих действий и ответственность лиц, их выполняющих. Необходимы также процедуры, определяющие действия, выполняемые при выявлении неполной или ошибочной регистрации данных.

Данные должны регистрироваться своевременно. В этих целях может использоваться специальное оборудование, не позволяющее произвольно менять дату и время записей (компьютеризированных часов) для датирования документов.

Полученные данные должны быть занесены в первичные карты. Требования к оформлению бланков первичной документации должны быть описаны во внутренней процедуре испытательного центра. Бланки первичной документации чаще всего разрабатывает руководитель исследования после согласования дат проведения экспериментальной части исследования.

В любом бланке первичной документации должна быть отражена следующая информация:

- наименование документа: первичная карта, лист введения и т.д.;
- код исследования;
- дата эксперимента (если дизайном исследования предусмотрено многократное выполнение манипуляций в разные дни, то в документе должно быть предусмотрено соответствующее место для указания дат);
- информация о тест-системе (вид и пол животных);
- номер экспериментальной группы;
- код, доза, путь введения объекта исследования.

Форма таблиц регистрации зависит от дизайна исследования и определяется руководителем исследования. Все ячейки следует оформлять в едином стиле, на основании стандартов заполнения таблиц, принятых при оформлении исследования. В таблицах необходимо указывать размерность полученных величин. Рядом с полем для регистрации данных должна быть ячейка (строчка) для даты, подписи и фамилии исполнителя.

Дизайн таблицы с первичными данными должен быть выбран таким образом, чтобы исполнитель мог быстро и максимально комфортно заполнить необходимые пункты. Например, если карты содержат несколько показателей, регистрируемых одновременно (в динамике теста), то показатели необходимо размещать на одной стороне листа первичной карты по частоте встречаемости слева направо, начиная с самых частых и заканчивая самыми редко встречающимися показателями («Открытое поле»: 1 – количество квадратов, 2 – пристеночные стойки, ... 6 – уринация, 7 – дефекация). Размер ячеек должен соответствовать максимальному объему данных, вносимых исполнителем.

Поправки и отклонения

Возможные поправки к плану или обнаруженные отклонения от плана исследования и (или) от стандартных операционных процедур

при выполнении манипуляций должны быть документированы¹⁷.

Поправка к плану исследования. Поправку к плану исследования оформляют в случае возникновения целенаправленного изменения, внесенного после даты начала проведения исследования или в случае выявления отклонения, по результатам исследования которого установлено его влияние на результаты исследования. В содержании поправки должно быть описание того, что было предусмотрено планом исследования, затем описание события, которое привело к изменениям, и описание изменения с обоснованием.

Необходимо оценить влияние изменений на полученные результаты исследования. Поправку необходимо согласовать со спонсором исследования. После оформления поправки руководитель исследования обязан предоставить копию оригинала поправки к плану исследования во все подразделения, вовлеченные в проведение исследования, в том числе сотрудникам службы качества. Оригиналы поправок должны храниться вместе с планом исследования и передаваться в архив.

Отклонение от плана исследования. Руководитель исследования оценивает и документирует влияние любых отклонений от плана исследования на качество и достоверность результатов исследования, при необходимости предпринимает соответствующие корректирующие мероприятия. О возникшем отклонении необходимо оповестить спонсора исследования, а затем согласовать с ним уже оформленный документ.

Процесс управления отклонениями, как правило, состоит из следующих этапов:

- идентификация отклонения;
- регистрация отклонения;
- меры коррекции (незамедлительные действия);
- поиск корневых причин и оценка их влияния (расследование);
- разработка плана корректирующих и предупреждающих действий (corrective and preventive actions, CAPA);
- реализация CAPA;
- оценка результативности CAPA.

Процесс управления отклонениями преимущественно осуществляется сотрудниками службы качества при проведении различных видов

инспекций, а также ответственными по качеству в структурных подразделениях. Важно предоставить возможность выявления и документирования отклонений всем сотрудникам испытательного центра, чтобы минимизировать риск пропуска незарегистрированных отклонений. Для этого можно разработать простую форму, которую легко заполнит любой сотрудник, заметивший отклонение. Затем эта форма передается в службу качества и (или) руководителю исследования, что поможет оперативно и квалифицированно разобраться в сложившейся ситуации.

Риск-ориентированный подход в отношении расследования отклонений включает два основных принципа управления рисками для качества¹⁸:

- оценка риска для качества должна основываться на научных знаниях;
- степень усилий, формализации и документирования процесса управления рисками для качества должна соотноситься с уровнем риска.

Завершение исследования

При получении первичной документации руководитель исследования переводит данные в электронный формат, проводит их обработку и после анализа оформляет итоговый отчет¹⁹ в соответствии с процедурами, утвержденными в испытательном центре.

Итоговый отчет необходимо составлять в форме детализированного документа, в котором указаны цель и задачи исследования, описаны использованные методы и материалы, обобщены полученные данные и результаты их анализа, представлены выводы. Итоговый отчет должен быть подписан и датирован руководителем исследования со свидетельством о принятии ответственности за достоверность данных.

Руководитель исследования обязан указать в итоговом отчете области исследования, не соответствующие правилам надлежащей лабораторной практики, если таковые имелись.

При проведении исследований с использованием любых видов животных рекомендуется следовать правилам руководства ARRIVE [15], которое универсально и применимо к различным областям исследований, особенно для описания сравнительных исследований в лаборатории.

¹⁷ Там же, часть III, раздел 2 «Персонал испытательной лаборатории», п. 15; раздел 7 «Стандартные операционные процедуры», п. 51.

¹⁸ ICH Q9 Quality risk management. EМА/СНМР/ICH/24235/2006.

¹⁹ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», часть III, раздел 2 «Персонал испытательной лаборатории», п. 14, 15.

Эти рекомендации также пригодны для поисковых исследований, исследований, проводимых в полевых условиях, и при использовании тканей животных.

Ответственность за научную достоверность результатов лежит на руководителе исследования, а не на спонсоре, обязанностью которого является принятие решения о представлении или непредставлении исследуемого объекта на регистрацию в уполномоченный орган (экспертную организацию).

Обязательные и возможные приложения к итоговому отчету и правила их оформления должны быть описаны в отдельной стандартной операционной процедуре. После оформления итогового отчета руководитель исследования комплектует документы по исследованию и передает их в архив²⁰.

Обязанности сотрудников службы качества в ходе выполнения исследования

В ходе выполнения исследования сотрудники службы качества обязаны проводить инспекцию отдельного исследования²¹. Этапы инспекции могут включать:

- проверку плана исследования²²;
- проверку плана-графика исследования;
- проверку документации (первичных карт)²³;
- проверку экспериментальной части исследования²⁴;
- проверку итогового отчета²⁵;
- проверку комплектности итогового отчета перед сдачей в архив (наличия всех необходимых приложений к отчету, правильности их оформления, нумерации страниц и т.д.).

Все этапы инспекции отдельного исследования со стороны службы качества должны быть документированы. Варианты документирования могут быть различны: например, отдельный

чек-лист на каждый этап проверки или один чек-лист на всю проверку. По окончании проверки отдельного исследования сотрудник службы качества оформляет заключение, оригинал которого передается руководителю исследования для включения в итоговый отчет в качестве приложения. В заключении службы качества должны быть отражены все этапы инспекции отдельного исследования и сделан общий вывод о соответствии или несоответствии (возможно, отдельных этапов) правилам надлежащей лабораторной практики.

Важно учесть, что сотрудники службы качества обязаны письменно информировать руководство испытательной лаборатории, руководителя исследования, ведущего исследователя и, при необходимости, других руководителей о результатах инспекции²⁶. Чтобы соблюсти данное требование, можно предусмотреть графы для всех необходимых подписей в чек-листах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлен вариант документирования всех процедур при выполнении доклинического исследования, который может быть использован испытательными центрами в их практической работе. На основании анализа правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза показано соответствие предложенного варианта документооборота регуляторным требованиям к деятельности руководителя исследования и к порядку проведения инспекций отдельного исследования службой качества испытательного центра. Учитывая необходимую гибкость эффективной системы менеджмента качества, любой этап процедуры и (или) документ может быть видоизменен в зависимости от целей конкретного исследования с учетом соблюдения принципов надлежащей лабораторной практики.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kilkenny C, Parsons N, Kadyszewski E, Festing MF, Cuthill IC, Fry D, et al. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. *PLoS One*. 2009;4(11):e7824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007824>
2. Prinz F, Schlange T, Asadullah K. Believe it or not: How much can we rely on published data on potential drug targets? *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(9):712. <https://doi.org/10.1038/nrd3439-c1>
3. Sansone SA, McQuilton P, Rocca-Serra P, Gonzalez-Beltran A, Izzo M, Lister AL, et al. FAIRsharing as a community approach to standards, repositories and policies. *Nat Biotechnol*. 2019;37(4):358–67. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0080-8>
4. Percie du Sert N, Bamsey I, Bate ST, Berdoy M, Clark RA, Cuthill IC, et al. The experimental design assistant. *Nat Methods*. 2017;14(11):1024–5. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4462>

²⁰ Там же, часть III, раздел 2 «Персонал испытательной лаборатории», п. 15.

²¹ Там же, часть III, раздел 1 «Система обеспечения качества», п. 11.

²² Там же.

²³ Там же.

²⁴ Там же.

²⁵ Там же.

²⁶ Там же.

5. Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RB, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol.* 2014;14:43. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>
6. Sil A, Bespalov A, Dalla C, Ferland-Beckham C, Herremans A, Karantzas K, et al. PEERS – an open science “Platform for the Exchange of Experimental Research Standards” in biomedicine. *Front Behav Neurosci.* 2021;15:755812. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.755812>
7. International Brain Laboratory. An International Laboratory for Systems and Computational Neuroscience. *Neuron.* 2017;96(6):1213–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.013>
8. Stone K. NerveCenter: Unintended effects of biologic drug market protection. *Ann Neurol.* 2010;68(5):A11–2. <https://doi.org/10.1002/ana.22301>
9. Simera I, Moher D, Hirst A, Hoey J, Schulz KF, Altman DG. Transparent and accurate reporting increases reliability, utility, and impact of your research: Reporting guidelines and the EQUATOR Network. *BMC Med.* 2010;8:24. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-24>
10. Macleod MR, Michie S, Roberts I, Dirnagl U, Chalmers I, Ioannidis JP, et al. Biomedical research: Increasing value, reducing waste. *Lancet.* 2014;383(9912):101–4. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)62329-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)62329-6)
11. Vollert J, Schenker E, Macleod M, Bespalov A, Wuerbel H, Michel M, et al. Systematic review of guidelines for internal validity in the design, conduct and analysis of preclinical biomedical experiments involving laboratory animals. *BMJ Open Sci.* 2020;4(1):e100046. <https://doi.org/10.1136/bmjos-2019-100046>
12. Henderson VC, Kimmelman J, Fergusson D, Grimshaw JM, Hackam DG. Threats to validity in the design and conduct of preclinical efficacy studies: A systematic review of guidelines for *in vivo* animal experiments. *PLoS Med.* 2013;10(7):e1001489. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001489>
13. Smith AJ, Clutton RE, Lilley E, Hansen KEA, Brattellid T. PREPARE: Guidelines for planning animal research and testing. *Lab Anim.* 2018;52(2):135–41. <https://doi.org/10.1177/0023677217724823>
14. Vollert J, Macleod M, Dirnagl U, Kas MJ, Michel MC, Potschka H, et al. The EQUIPD framework for rigor in the design, conduct, analysis and documentation of animal experiments. *Nat Methods.* 2022;19(11):1334–7. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01615-y>
15. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020;18(7):e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
16. Batista Leite S, Brooke M, Carusi A, Collings A, Deceuninck P, Dechamp J, et al. *Promoting reusable and open methods and protocols (PRO-MaP)*. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2024. <https://doi.org/10.2760/46124>
17. Ходько СВ, Макарова МН, Макаров ВГ, Салынов СС, Родионова НВ. Определение критических фаз экспериментальной части научно-исследовательской работы с использованием лабораторных животных: анализ рисков. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2021;11(3):193–201. Khodko SV, Makarova MN, Makarov VG, Salynov SS, Rodionova NV. Determination of the critical phases of the experimental research using laboratory animals: Risk analysis. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2021;11(3):193–201 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-193-201>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: С.В. Ходько – сбор, систематизация и обобщение данных, изложенных в нормативных и методических документах и литературе, написание текста рукописи; М.Н. Макарова – критический пересмотр и утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; В.Г. Макаров – концепция исследования.

Authors' contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Svetlana V. Khodko collected, systematised, and summarised data from regulatory documents, guidelines, and literature and drafted the manuscript. Marina N. Makarova critically revised manuscript and approved the final version for publication. Valery G. Makarov conceptualised the study.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Ходько Светлана Владимировна, канд. мед. наук / **Svetlana V. Khodko**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6935-075X>

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

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

Макаров Валерий Геннадиевич, д-р мед. наук / **Valery G. Makarov**, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>

Поступила 23.09.2024

После доработки 29.10.2024

Принята к публикации 04.12.2024

Online first 15.02.2025

Received 23 September 2024

Revised 29 October 2024

Accepted 4 December 2024

Online first 15 February 2025



К.Л. Крышень ✉ 
Я.А. Гушин 
Н.М. Фаустова 
С.В. Гущина 
Ж.Ю. Устенко 
А.Е. Кательникова 
К.Т. Султанова 
А.А. Матичин 
В.А. Вавилова 
Я.Г. Муразов 
М.В. Мирошников 
М.А. Ковалева 
Д.В. Шубин 
В.Г. Макаров 
М.Н. Макарова 

Интерпретация данных токсикологических исследований лекарственных средств при определении дозы, не вызывающей видимых нежелательных эффектов (NOAEL)

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

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

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Токсикологические исследования лекарственных средств на лабораторных животных — обязательный этап оценки риска применения лекарственных средств, направленный на выявление токсических эффектов, их потенциальной обратимости и зависимости от дозы и (или) системной экспозиции. Основным количественным результатом токсикологических исследований является доза, не вызывающая видимых нежелательных эффектов (NOAEL). Ключевым практическим применением NOAEL является выбор стартовой дозы для ранних фаз клинических исследований. Для выбора NOAEL необходимо четко определить, какие именно изменения следует считать нежелательными. Дизайн токсикологического исследования является сложным и включает в себя широкий спектр оцениваемых параметров: физиологических, инструментальных, клинико-лабораторных, патоморфологических. По окончании эксперимента накапливается большой массив данных, который требуется проанализировать и дать научно обоснованную оценку обнаруженным изменениям.

ЦЕЛЬ. Разработка комплексного подхода к интерпретации данных токсикологических исследований лекарственных средств, направленного на повышение объективности при установлении дозы NOAEL.

ОБСУЖДЕНИЕ. Ввиду отсутствия терминологической строгости в описании дозы NOAEL в работе предпринята попытка по унификации этого термина. Отдельное внимание уделено вопросу биологической значимости наблюдаемых изменений, а также описанию критериев для определения их нежелательности. Разработанная схема интерпретации экспериментальных данных включает три последовательных этапа: анализ взаимосвязи между наблюдаемым эффектом и введением тестируемого объекта; оценка размера эффекта и (или) степени изменений; определение характера выявленных изменений с точки зрения их нежелательности, включая оценку их обратимости, фармакодинамической приемлемости, возможности развития адаптационной реакции и др. Ключевым элементом предложенной методологии является принцип весомости доказательств (Weight-of-Evidence), который позволяет ранжировать выявленные нежелательные эффекты по их значимости и интегрировать их в единую систему оценки.

ВЫВОДЫ. Разработанный комплексный подход, основанный на многофакторном анализе данных (включая количественные и качественные показатели) и принципе оценки весомости доказательств, может повысить объективность оценки наблюдаемых эффектов и определении дозы, не вызывающей видимых нежелательных эффектов (NOAEL).

Ключевые слова: токсикологические исследования; лабораторные животные; биологическая значимость; нежелательные эффекты; доза, не вызывающая видимых нежелательных эффектов; NOAEL; принцип оценки весомости доказательств; доклинические исследования

Для цитирования: Крышень К.Л., Гушин Я.А., Фаустова Н.М., Гущина С.В., Устенко Ж.Ю., Кательникова А.Е., Султанова К.Т., Матичин А.А., Вавилова В.А., Муразов Я.Г., Мирошников М.В., Ковалева М.А., Шубин Д.В., Макаров В.Г., Макарова М.Н. Интерпретация данных токсикологических исследований лекарственных средств при определении дозы, не вызывающей видимых нежелательных эффектов (NOAEL). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(3):262–277. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-262-277>

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. М.Н. Макарова является членом редколлегии журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» с 2018 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Kirill L. Kryshen ✉ 
Yaroslav A. Gushchin 
Natalia M. Faustova 
Svetlana V. Gushchina 
Zhanna Yu. Ustenko 
Anastasiia E. Katelnikova 
Kira T. Sultanova 
Alexandr A. Matichin 
Valeria A. Vavilova 
Iaroslav G. Murazov 
Mikhail V. Miroshnikov 
Mariya A. Kovaleva 
Dmitriy V. Shubin 
Valery G. Makarov 
Marina N. Makarova 

Interpretation of Toxicological Research Data in Establishing the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) for Medicinal Products

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

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

ABSTRACT

INTRODUCTION. Toxicological studies of new pharmaceuticals in laboratory animals represent an obligatory stage in drug risk assessment, designed to identify toxic effects, their potential reversibility, and dependence on dose and/or systemic exposure. The primary quantitative outcome of these studies is the no-observed-adverse-effect level (NOAEL), whose key practical application involves determining the starting dose for early-phase human clinical trials. The very definition of NOAEL raises the fundamental question: which experimental changes should be classified as adverse? Toxicology study designs are complex, incorporating a comprehensive range of evaluation parameters including physiological, instrumental, clinical laboratory, and pathological morphological assessments. Upon study completion, researchers accumulate extensive datasets requiring rigorous scientific analysis and evidence-based interpretation of all detected changes.

AIM. The aim of this study is to develop a comprehensive methodology for interpreting toxicological data to enhance objectivity in NOAEL determination.

DISCUSSION. Due to the lack of terminological rigor in describing the NOAEL dose, the present work attempts to unify this term. Particular attention is given to the issue of biological significance of observed changes, as well as the description of criteria for determining their adversity. The developed scheme for interpreting experimental data encompasses three consecutive stages: analysis of the relationship between the observed effect and the administration of the test object; assessment of the effect size and/or degree of changes; determination of the nature of the identified changes in terms of their adversity, including evaluation of their reversibility, pharmacodynamic acceptability, potential for developing an adaptive response, and others. The cornerstone of the proposed methodology is the Weight-of-Evidence principle, which enables ranking of identified adverse effects according to their significance and their integration into a unified assessment system.

CONCLUSIONS. The developed integrated approach, based on multifactorial data analysis (including quantitative and qualitative indicators) and the Weight-of-Evidence assessment principle, can enhance the objectivity of evaluating observed effects and determining the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL).

Keywords: toxicological studies; laboratory animals; biological significance; adverse effects; NOAEL (No Observed Adverse Effect Level); Weight-of-Evidence principle; preclinical studies

For citation: Kryshen K.L., Gushchin Ya.A., Faustova N.M., Gushchina S.V., Ustenko Zh.Yu., Katelnikova A.E., Sultanova K.T., Matichin A.A., Vavilova V.A., Murazov Ia.G., Miroshnikov M.V., Kovaleva M.A., Shubin D.V., Makarov V.G., Makarova M.N. Interpretation of toxicological research data in establishing the no observed adverse effect level (NOAEL) for medicinal products. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(3):262–277. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-262-277>

Funding. The study was performed without external funding

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

ВВЕДЕНИЕ

Токсикологические исследования с использованием лабораторных животных являются неотъемлемой частью комплексного изучения безопасности новых лекарственных средств и позволяют оценить потенциальные риски при первом клиническом применении у человека. Для оригинального лекарственного средства необходимо провести широкий спектр исследований безопасности, включая изучение общетоксических свойств при однократном и многократном введении, фармакологической безопасности, репродуктивной токсичности, специфических видов токсичности¹. Основной целью исследований безопасности является выявление токсических эффектов, их потенциальной обратимости и зависимости от дозы и (или) системной экспозиции. Полученная информация в дальнейшем используется для определения безопасного диапазона доз при проведении ранних фаз клинических исследований и параметров клинического мониторинга потенциальных нежелательных реакций.

Наиболее важным количественным результатом исследований безопасности является NOAEL (no observed adverse effect level) – доза, не вызывающая видимых нежелательных эффектов. Этот показатель дополняет такие классические параметры, как терапевтический индекс (ТИ = ЛД50/ЕД50) и широта терапевтического действия, обеспечивая более комплексную оценку рисков. Классический ТИ отражает результат острой

токсичности, связанной с летальным исходом, и не учитывает нежелательные эффекты, возникающие ниже порога летальности, – функциональные нарушения, хронические токсические реакции или органоспецифические повреждения. В отличие от ТИ, NOAEL определяет максимальную дозу, при которой отсутствуют все видимые нежелательные эффекты, включая сублетальные и долгосрочные. Это позволяет установить «нижнюю границу» токсического диапазона, критически важную для расчета широты терапевтического действия – интервала между минимальной эффективной дозой и дозой, вызывающей первые токсические проявления (близкой к NOAEL).

Практическим применением NOAEL для оригинальных лекарственных средств является расчет стартовой дозы для первой фазы клинических исследований². Дозу NOAEL также используют для оценки рисков при производстве лекарственных средств, в частности расчете допустимых пределов воздействия химических субстанций на здоровье человека, уровня PDE (допустимая ежедневная экспозиция, permitted daily exposure)³.

Следует отметить отсутствие терминологической строгости в описании дозы NOAEL. Так, в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств⁴ NOAEL определяется как доза без наблюдаемого отрицательного эффекта,

¹ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

² Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Guidance for industry. Rockville: Food and Drug Administration; 2005.

³ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.01.2020 № 1 «Об утверждении Руководства по установлению допустимых пределов воздействия на здоровье в целях идентификации рисков при производстве лекарственных средств на общих производственных (технологических) линиях».

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

в ГОСТ Р 56701-2015⁵ используется понятие высокой нетоксической дозы, в решении Совета Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) № 78⁶ NOAEL описывается как уровень невыявления нежелательного воздействия, в решении Коллегии ЕЭК № 202⁷ – как доза, не оказывающая явного нежелательного эффекта, в решении Коллегии ЕЭК № 1⁸ – как доза, не оказывающая видимого нежелательного эффекта. В открытых источниках литературы также встречается интерпретация NOAEL как дозы, не вызывающей видимых побочных эффектов, дозы без наблюдаемых нежелательных эффектов и др. Все вышеперечисленные определения отражают суть этого уровня доз и фактически представляют разные варианты перевода англоязычного термина.

Необходимо предпринять попытку унификации рабочего определения термина NOAEL, который дословно переводится как «доза без наблюдаемых неблагоприятных эффектов». В Федеральном законе Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» дается определение таким терминам, как «побочное действие» и «нежелательная реакция». Побочное действие может иметь как терапевтическую ценность, так и негативные последствия для организма. Например, седативный эффект, возникающий при применении H₁-антигистаминных препаратов первого поколения, может быть целенаправленно использован в качестве дополнительного снотворного действия. Нежелательная реакция – это непреднамеренная неблагоприятная реакция организма, которая может быть связана с применением лекарственного препарата. С этой точки зрения термин «нежелательная реакция» точнее отражает именно негативные последствия приема лекарственного средства, в отличие от более общего термина «побочное действие», который может включать и полезные эффекты препарата.

Нежелательная реакция и нежелательный эффект – также разные, хотя и связанные понятия.

Вариант с «реакцией» чуть менее точен, так как в контексте определения безопасной дозы важнее говорить именно об эффекте как итоге воздействия. Термин «видимые» в определении NOAEL отражает нежелательные эффекты, которые могут быть зафиксированы при визуальном осмотре или с помощью базовых диагностических методов, фокусируясь на наиболее очевидных и значимых проявлениях токсического действия, включая маркеры явной токсичности (клинические признаки, макро- и микроскопические поражения), суррогатные маркеры токсичности (например, уровень ферментов печени в сыворотке), а также маркеры чрезмерных фармакодинамических эффектов.

Таким образом, NOAEL целесообразно определить как *дозу, не вызывающую видимых нежелательных эффектов*.

При рассмотрении термина NOAEL критическим является вопрос, какой уровень воздействия в эксперименте следует считать нежелательным, а какой нет. Нежелательным эффектом называют *связанное с тестируемым объектом изменение морфологии, физиологии, роста, развития, репродуктивной функции или продолжительности жизни тест-системы, которое приводит к ухудшению функциональной способности поддерживать гомеостаз и/или ухудшению способности реагировать на дополнительные нагрузки со стороны окружающей среды* [1]. В Руководстве Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (FDA) по выбору стартовой дозы в клинических исследованиях подчеркивается, что нежелательным эффектом является такой эффект, который был бы неприемлемым при первом применении препарата у человека⁹.

В токсикологических исследованиях нередко можно наблюдать изменения отдельных параметров по сравнению с контрольной группой, но лишь часть из них можно отнести к категории действительно нежелательных. Например, гипогликемию, индуцированную введением

⁵ ГОСТ Р 56701-2015 Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств.

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

⁷ Решение Коллегии ЕЭК от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

⁸ Решение Коллегии ЕЭК от 14.01.2020 № 1 «Об утверждении Руководства по установлению допустимых пределов воздействия на здоровье в целях идентификации рисков при производстве лекарственных средств на общих производственных (технологических) линиях».

⁹ Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Guidance for industry. Rockville: Food and Drug Administration; 2005.

инсулина здоровым животным, можно считать ожидаемым фармакодинамическим эффектом. Незначительное повышение активности печеночных ферментов с сохранением нормальной архитектоники печени может отражать адаптационные процессы, связанные с метаболизмом лекарственного средства, и тоже не учитываться при определении NOAEL. В то же время выраженные гистологические изменения (такие как некроз гепатоцитов даже при отсутствии статистически значимых изменений в активности печеночных ферментов) могут свидетельствовать о токсическом воздействии и служить ключевым основанием для установления NOAEL.

Отсутствие четких критериев нежелательности при оценке токсикологического профиля тестируемого объекта затрудняет интерпретацию данных, что подтверждается продолжающимися дискуссиями на международных симпозиумах и в научной литературе. R. Lewis и соавт. [2] предложили поэтапную методологию выявления нежелательных эффектов, которая в дальнейшем была дополнена и развита другими авторами [3–7].

При анализе существующих подходов к оценке NOAEL обращает на себя внимание отсутствие четкого разграничения между количественными и качественными данными. В работе V. Kale и соавт. [7] были выделены ключевые аспекты и критерии выявления нежелательных токсикологических эффектов. Однако некоторым вопросам, на наш взгляд, уделяется недостаточно внимания, в частности обсуждению биологической значимости выявляемых отличий, поскольку ряд источников определяют дозу NOAEL как наивысший уровень воздействия, при котором не наблюдается статистически или биологически значимого увеличения частоты и (или) тяжести неблагоприятных эффектов в сравнении с соответствующим контролем [2, 3]. Остается неясным, что именно подразумевается под биологически значимым эффектом, означает ли это, что статистически незначимые отличия необходимо учитывать при оценке нежелательности выявленных эффектов? Неоднозначность трактовки биологической значимости создает методологические сложности при анализе и интерпретации статистически незначимых отличий, а также при определении критериев нежелательности при оценке токсикологического риска.

Вопросы оценки биологической значимости наравне с оценкой нежелательности эффектов

являются, по всей видимости, наиболее дискуссионными и требуют междисциплинарного подхода.

Цель работы – разработка комплексного подхода к интерпретации данных токсикологических исследований лекарственных средств, направленного на повышение объективности при установлении дозы NOAEL.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Определение взаимосвязи между наблюдаемым эффектом и введением тестируемого объекта. Биологическая значимость изменений

Ключевым экспериментом, позволяющим получить основную информацию о потенциальных нежелательных эффектах лекарственного средства, является исследование токсичности при многократном введении¹⁰. В зависимости от планируемого курса клинического применения длительность эксперимента может составлять от 2 нед. до 9 мес. и более. В исследованиях общетоксических свойств рекомендуется испытание как минимум трех доз. При этом дозы выбираются тщательно, исходя из предположения, что у животных, подвергшихся воздействию низкой дозы, не проявится никакого эффекта по сравнению с контролем, а высокая доза будет обеспечивать достаточный уровень токсического воздействия без избыточной гибели животных [8].

Все получаемые в ходе эксперимента данные можно разделить на количественные и качественные (рис. 1). Количественные данные могут быть представлены непрерывными (масса тела, массовые коэффициенты, биохимические или гематологические параметры и др.), а также дискретными (количество павших животных, количество животных с тем или иным признаком и др.) данными. Качественные данные подразделяют на номинальные (картина интоксикации, гистологические находки и др.), порядковые (степень изменений и баллы гистологического исследования), бинарные (наличие или отсутствие какого-либо признака/исхода).

Количественные данные. Для каждого оцениваемого показателя исследователь вычисляет точечную и интервальную оценку в зависимости от типа и распределения данных и формирует итоговые таблицы, объединенные по соответствующим разделам.

¹⁰ Решение Коллегии ЕЭК от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

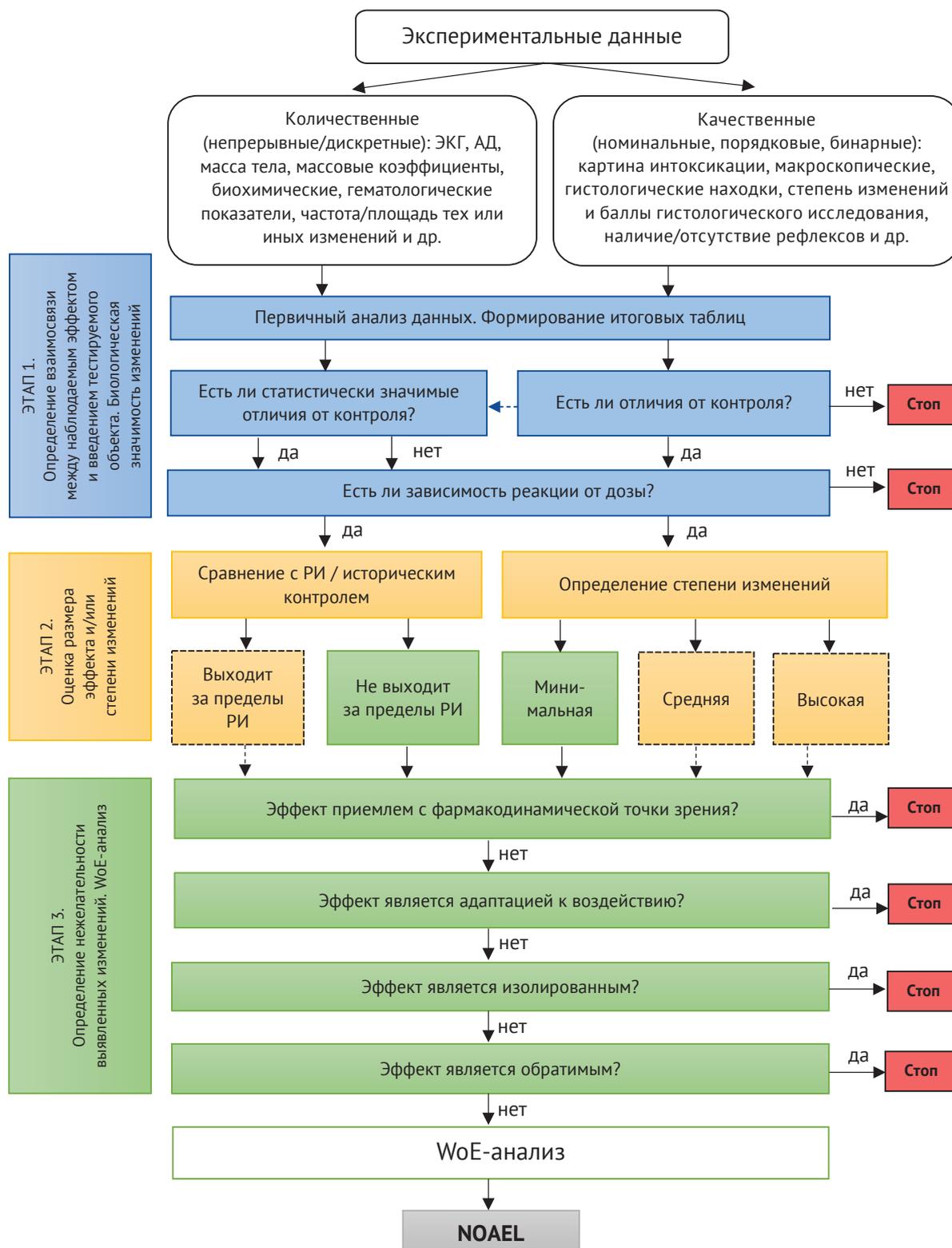


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 1. Возможная схема определения нежелательных эффектов и выбора NOAEL в токсикологических исследованиях. ЭКГ – электрокардиограмма, АД – артериальное давление, РИ – референтные интервалы, WoE-анализ – Weight-of-Evidence-анализ, анализ весомости доказательств

Fig. 1. A possible scheme for determining adverse effects and selecting NOAEL in toxicological studies. ECG – electrocardiogram, BP – blood pressure, RI – reference intervals, WoE analysis – Weight-of-Evidence analysis

Несмотря на все усилия получить максимально гомогенные группы животных по возрасту, массе тела, клиническому состоянию, исследователи могут столкнуться с экстремально низкими или высокими значениями отдельных клинико-лабораторных показателей (выбросами), которые отличаются от основной выборки. Существует множество причин возникновения выбросов, включая ошибку измерения, ошибку выборки, неправильную регистрацию или неверную спецификацию предположений о распределении. Выбросы могут быть определены путем визуальной оценки первичных данных, однако решение об исключении результатов нужно принимать, опираясь на специальные статистические критерии, например критерий Граббса [9]. В случае если экстремальные показатели обнаружены и при оценке других связанных параметров, это может указывать на наличие индивидуальной чувствительности к токсическому воздействию лекарственного препарата, и данные этого животного необходимо учитывать при интерпретации полученных данных.

Неотъемлемой частью любого исследования является проверка статистических гипотез. На этапе подготовки плана (протокола) исследования необходимо установить критический уровень значимости α (как правило, 0,05), а также мощность $(1-\beta)$, обычно принимаемую за 80%. Выбор подходящего статистического метода зависит от цели и задач исследования, типа и распределения данных, а также характера наблюдений. В данной публикации не представлено описание статистических подходов, однако важно подчеркнуть необходимость грамотного планирования и выполнения статистического анализа, от которого во многом зависит обоснованность сделанных выводов [10].

После проведения статистического анализа необходимо оценить дозозависимый характер

реакции. Так, большинство авторов пришли к выводу, что ключевым фактором, который может свидетельствовать о непосредственном воздействии лекарственного препарата на организм животного, является наличие прямой зависимости реакции от дозы. При этом верно и обратное: отсутствие прямой зависимости реакции от дозы является достаточным аргументом, чтобы не считать обнаруженные изменения следствием введения тестируемого объекта [2, 3, 7].

В представленном примере (табл. 1) дозозависимое повышение активности аспартатамино-трансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и уровня билирубина свидетельствует о воздействии тестируемого объекта на организм животных. В то же время статистически значимые изменения уровня общего белка в группе животных, получивших исследуемый препарат в низкой дозе, вероятно, не имеют причинно-следственной связи с исследуемым воздействием, так как не демонстрируют прямого дозозависимого эффекта.

Применение этого простого правила допустимо только при линейной фармакокинетике. Для подтверждения взаимосвязи между эффектом и экспозицией тестируемого объекта необходимо включать в дизайн исследования оценку ключевых токсикокинетических параметров, таких как площадь под фармакокинетической кривой (AUC) и (или) максимальная концентрация в плазме (C_{max}). Это позволит установить взаимосвязь между концентрацией препарата в плазме крови и частотой возникновения или тяжестью наблюдаемого эффекта, что критически важно для правильной интерпретации полученных результатов.

Однако следует учитывать, что подобный подход может быть некорректным и привести к ложным

Таблица 1. Пример оценки зависимости изменений биохимических параметров от дозы тестируемого лекарственного средства при проведении токсикологического исследования на крысах, $M \pm SD$ (среднее значение \pm стандартное отклонение), $n=5$

Table 1. Example of assessing the relationship between changes in biochemical parameters and the dose of the tested pharmaceutical agent during a toxicological study in rats, $M \pm SD$ (mean \pm standart deviation), $n=5$

Исследуемые показатели	Контрольная группа	Тестируемый объект		
		Низкая доза	Средняя доза	Высокая доза
Аспартатаминотрансфераза (АСТ), Ед/л	143 \pm 53	140 \pm 21	163 \pm 10	222 \pm 25*
Аланинаминотрансфераза (АЛТ), Ед/л	54 \pm 17	58 \pm 6	70 \pm 10	141 \pm 70*
Билирубин общий, мкмоль/л	1,80 \pm 0,36	1,90 \pm 0,28	2,40 \pm 0,23	2,70 \pm 0,65
Общий белок, г/л	62 \pm 2	73 \pm 0,6*	66 \pm 3	66 \pm 4

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

* Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, критерий Даннета, отличия статистически значимы в сравнении с контрольной группой, $p < 0,05$

выводам. Известно, что для некоторых соединений зависимость «доза–эффект» может иметь нелинейную форму, обратную дозозависимость, приближаться к U-образной или перевернутой U-образной кривой. Такие немонотонные зависимости характерны, например, для многих гормонов и так называемых эндокринных дизрапторов [11]. В таких случаях требуется комплексный подход к анализу данных с учетом возможных нелинейных зависимостей.

Качественные данные. На схеме, представленной на *рисунке 1*, возможность статистической обработки качественных данных обозначена пунктиром, поскольку в ряде ситуаций (например, при регистрации гибели животных) достаточно констатации самого факта наличия этих изменений в экспериментальных группах, чтобы сделать вывод о влиянии исследуемого объекта.

Для статистического анализа качественных данных применяются специализированные методы, включая частотный и регрессионный анализ, анализ времени до наступления событий. Приемлемо использование порядковых шкал, позволяющих ранжировать выраженность эффекта (например, от минимальных до тяжелых изменений) на основе интенсивности отдельных признаков. Например, для анализа гистопатологических изменений широко используют балльные шкалы оценки степени (0 – нет, 1 – минимальное, 2 – слабое, 3 – умеренное и 4 – выраженное) или доли пораженной ткани (0 – норма, 1 – ≤25%, 2 – 26–50%, 3 – 51–75%, 4 – >75%).

Важно учитывать, что при гистологическом исследовании органов и тканей лабораторных животных встречается достаточно много различных отклонений от нормы, причем некоторые могут быть отнесены к фоновым патологиям, напрямую не связанным с воздействием тестируемого объекта. Поэтому для корректной интерпретации результатов необходимо тщательно дифференцировать вызванные препаратом изменения от фоновых патологий.

Среди фоновой патологии у лабораторных животных можно выделить: возрастные изменения – патологические изменения, частота которых коррелирует со старением организма; спонтанные изменения – нарушения, не связанные с внешними факторами (включая возраст); изменения, индуцированные манипуляциями (прижизненными процедурами (внутримышечные инъекции, травматизация кожи при бритье и др.), использованием вспомогательных веществ (крахмальная взвесь, масла, твин и другие носители для введения тестируемых объектов), эвтаназией.

Спектр ассоциированной с возрастом патологии у мелких лабораторных грызунов затрагивает все органы и системы организма, включая дыхательную, сердечно-сосудистую, мочевыделительную, репродуктивную, пищеварительную системы. Так, например, к наиболее частым возрастным патологиям лабораторных крыс относят хроническую прогрессирующую нефропатию [12], а также злокачественные новообразования [13, 14]. Патологические изменения, связанные с возрастом, необходимо учитывать в первую очередь в хронических экспериментах длительностью 6 и более месяцев.

Спонтанные патологии характерны для всех видов лабораторных животных [15]. В частности, R. Chamanza и соавт. проведено большое ретроспективное исследование с целью определения частоты и диапазона спонтанных проявлений патологии у яванских макаков, которых широко используют в качестве релевантной тест-системы в исследованиях безопасности большинства моноклональных антител и многих генотерапевтических лекарственных средств. Наиболее частой находкой были лимфоплазмозитарные инфильтраты, наблюдавшиеся в печени, почках, сердце, слюнных железах и желудке. Частыми дегенеративными нарушениями являлись локализованные жировые изменения в печени, дегенерация миокарда, а также минерализация и пигментные отложения в различных тканях [16].

Для того чтобы определить, относятся ли выявленные изменения к возрастным или спонтанным патологиям, необходимо сравнить частоту этих изменений с данными литературы или, что корректнее, с внутрилабораторными нормами (историческим контролем). В литературе крайне редко встречаются данные по частоте встречаемости спонтанных патологий, исследование [16] является редким исключением, и зачастую обзоры ограничены только описанием. В этой связи возникает необходимость накапливать собственные данные и формировать внутрилабораторные нормы по частоте встречаемости возрастных и спонтанных патологий у разных видов лабораторных животных.

Экспериментальные манипуляции, включая стандартные процедуры введения исследуемых препаратов, эвтаназии и др., часто становятся источником артефактов, которые необходимо учитывать при интерпретации данных. Так, используемые в эксперименте способы введения лекарственных средств животным могут приводить к повреждению тканей вследствие простого механического воздействия, например

при внутримышечном или эндотрахеальном введении. Воздействие углекислого газа как гуманного метода эвтаназии грызунов приводит к постмортальному развитию отека и геморрагиям в тканях легких [17].

Вспомогательные компоненты и носители также способны вызывать неспецифические патологические изменения. Например, оливковое масло, используемое в качестве носителя, может длительное время сохраняться в тканях организма и вызывать образование липогранулем, причем эти образования могут появляться не только в месте введения, но и в отдаленных от него областях [18]. Адьюванты на основе гидроксида алюминия вызывают локальное воспаление в месте инъекции, что является частью иммунологического механизма действия [19]. Такие фоновые изменения могут затруднять интерпретацию полученных данных.

Включение в дизайн исследования дополнительных контрольных групп, таких как интактная группа (без введения объектов), группа плацебо (введение вспомогательных компонентов без активного вещества), позволяют оценить вклад экспериментальных процедур, носителей или вспомогательных компонентов в наблюдаемые эффекты, снижая возможность ложной интерпретации.

Для подтверждения причинно-следственной связи между введением исследуемого препарата и патоморфологическими изменениями, как и в случае с количественными данными, требуется установить зависимость между дозой и выраженностью выявленных патологических изменений, оценить, как частоту их возникновения, так и степень тяжести. В таблице 2 представлен пример оценки взаимосвязи эффекта (с применением простой полуквантитативной шкалы) с введением тестируемого

объекта для гистопатологических изменений почек, встречающихся как спонтанная фоновая патология и в контрольной группе животных. В предложенном примере наблюдается дозозависимое увеличение частоты и степени тяжести патологии, что указывает на взаимосвязь эффекта с введением лекарственного средства.

В завершение обсуждения данного этапа следует отметить, что даже при отсутствии статистически значимых различий выявленные тенденции требуют особого внимания. Как следует из данных, представленных в таблице 1, концентрация билирубина, а также активность АЛТ и АСТ демонстрируют дозозависимый рост. При этом для билирубина статистическая значимость изменений не была достигнута при введении ни одной из исследуемых доз (критический уровень значимости $p > 0,05$). Подобные тенденции, даже при $p > 0,05$, требуют тщательного анализа, так как их комбинация может свидетельствовать о гепатотоксических свойствах исследуемого лекарственного средства. Совокупное повышение трех биохимических маркеров позволяет предположить определенное влияние на функциональную активность печени.

Аналогичная ситуация наблюдается и во втором примере: в группе животных, которым вводили среднюю дозу, частота патологических изменений не отличалась статистически от контроля ($p > 0,05$), однако их выраженность (тяжесть) возрастала. Даже при отсутствии значимых различий между группами прогрессирование морфофункциональных нарушений требует оценки в контексте их потенциальной опасности.

Все наблюдаемые статистически значимые и незначимые изменения, которые связаны с воздействием лекарственного средства, необходимо учитывать как биологически значимые в контексте дальнейшей оценки их нежелательности.

Таблица 2. Пример оценки зависимости частоты и тяжести гистологических изменений почек крыс от дозы тестируемого лекарственного средства при проведении токсикологического исследования

Table 2. Example of assessing the dose-dependent relationship between the frequency and severity of renal histological changes and the tested pharmaceutical agent in a rat toxicological study.

Обнаруженные патологические изменения		Контроль	Тестируемый объект		
			Низкая доза	Средняя доза	Высокая доза
Интерстициальная воспалительная клеточная инфильтрация	Слабовыраженная	1/10	2/10	1/10	0/10
	Умеренно выраженная	0/10	0/10	2/10	3/10
	Выраженная	0/10	0/10	2/10	5/10
Всего случаев		1/10	2/10	5/10	8/10
Критерий хи-квадрат, значение p			0,5312	0,051	0,0017

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

Под термином «биологическая значимость» понимается такая реакция организма, которая оказывает существенное или заслуживающее внимания влияние (положительное или отрицательное) на благополучие биологической тест-системы [2].

Для доказательства биологической значимости выявленных изменений необходимо строго придерживаться принципа дозовой зависимости и (или) воспроизводимости результатов в независимых сериях экспериментов. Так, при невозможности однозначно истолковать полученные результаты целесообразно инициировать последующее подтверждающее исследование. Обнаружив выраженное (не всегда статистически подтвержденное) отличие от контроля в группе воздействия, исследователь может разработать дизайн эксперимента, направленный на проверку конкретной гипотезы о значимости интересующего изменения с учетом предполагаемого эффекта и необходимой мощности анализа. Подобный подход хотя и является более затратным, позволит с большей уверенностью судить о полученных результатах и с большей объективностью оценивать риски клинического применения.

Таким образом, на первом этапе представленного подхода к интерпретации данных токсикологических исследований требуется определить биологически значимые изменения. Ключевым фактором при выборе этих изменений является оценка прямой зависимости реакции от дозы.

При этом статистическая значимость не всегда является обязательным условием для выбора биологически значимых отличий, поскольку обнаруженные тенденции могут являться следствием патологических изменений в ответ на введение лекарственного средства или быть предиктором более серьезных нарушений, которые могут возникнуть с увеличением дозы или длительности введения.

На втором этапе с целью первичной оценки потенциальной нежелательности выявленных биологически значимых эффектов необходимо определить величину (размер эффекта) или выраженность выявленных изменений.

Оценка размера эффекта и (или) степени изменений

Определение размера эффекта для количественных (непрерывных) данных или степени выраженности изменений качественных

показателей представляет собой важнейший этап в оценке нежелательности выявленных эффектов. Данная задача является методологически сложной и дискуссионной. В качестве примера можно привести снижение массы тела на 20%, которое является достаточно надежным интегральным критерием, указывающим на значительное ухудшение состояния животного, и часто используется в качестве гуманной конечной точки во многих экспериментах [20]. С другой стороны, только существенное (в 2–4 раза) увеличение активности АЛТ (в совокупности с другими биомаркерами) у грызунов будет указывать на развитие гепатотоксических эффектов¹¹. Для большинства параметров отсутствуют четкие критерии, что сильно усложняет интерпретацию результатов и требует разработки специальных подходов.

В области клинических исследований и метаанализа для оценки размера эффекта широкое распространение получили специальные математические подходы с использованием стандартизованной разницы средних (SMD), коэффициентов d Коэна, g Хеджеса, дельты Гласса и др. Используя категориальные правила оценки числовых значений относительного размера эффекта (например, для d коэффициента Коэна – малый 0,2; средний 0,5; большой 0,8; очень большой 1,3), можно судить о клинической эффективности лечения [21].

В доклинических исследованиях как эффективности, так и безопасности лекарственных средств подобные подходы не распространены. В частности, ряд авторов обоснованно утверждает, что в биомедицинских исследованиях с участием животных требуется разработка собственных категориальных оценок размера эффекта [22]. Тем не менее существуют некоторые простые приемы по оценке размера эффекта, которые удобно использовать в рутинной практике. Например, для определения порога нежелательности выявленных изменений в исследованиях безопасности возможно использование данных исторического контроля. Так, А. Kobayashi и соавт. предлагают провести сравнение данных экспериментальной группы с данными исторического контроля с помощью t -теста, а также убедиться, что все значения в экспериментальной группе лежат в пределах референтного интервала [23]. К подобному подходу нужно относиться с осторожностью, чтобы не исключить действительно значимые отличия [7]. Необходимо учитывать, что исторический

¹¹ Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity. European Medicines Agency; 2008.

контроль не описывает реальную исследуемую группу (как в случае с параллельной контрольной группой), и выборка может отличаться по условиям содержания, кормления, сезону, количеству манипуляций и др. [24].

Для более объективной и надежной интерпретации данных в испытательном центре необходимо вести отдельную работу по накоплению и систематизации данных контрольных групп у разных видов лабораторных животных с учетом линии, возраста, пола, сезона наблюдения. Референтные интервалы должны устанавливаться каждой лабораторией самостоятельно, так как зависят от преаналитического этапа, пробоподготовки, приборов, на которых проводился анализ, применяемых методик, реагентов и др.

После оценки размера эффекта для количественных данных становится возможным дифференцировать изменения, выходящие за пределы референтных интервалов, от тех, которые находятся в их пределах. Также и для качественных данных возможно ранжирование изменений в зависимости от интенсивности проявления конкретного признака – например, от минимальной до высокой степени тяжести или от слабовыраженной до выраженной.

Эффекты, выходящие за пределы референтных интервалов и характеризующиеся средней и высокой степенью тяжести, с большей вероятностью представляют собой действительно значимые нежелательные эффекты. Для формирования окончательного заключения необходим дальнейший анализ полученных данных с учетом следующих ключевых факторов:

- 1) фармакодинамическая приемлемость эффекта;
- 2) возможность адаптационной реакции организма на воздействие;
- 3) изолированность изменения;
- 4) обратимость выявленных эффектов.

Таблица 3. Оценка фармакодинамической приемлемости эффекта на примере курсового подкожного введения дарбэпоэтина крысам-самцам, $M \pm SD$ (среднее значение \pm стандартное отклонение), $n=5$

Table 3. Assessment of pharmacodynamic acceptability of the effect based on the example of course subcutaneous administration of darbepoetin to male rats, $M \pm SD$ (mean \pm standard deviation), $n=5$

Параметр	0,9% NaCl	Доза 1	Доза 2	Доза 3	ПИ
ретикулоциты, %	3,30 \pm 0,47	4,80 \pm 0,54	10,90 \pm 1,11*	19,70 \pm 2,46*	0–5,4
эритроциты, $10^{12}/л$	7,60 \pm 1,28	8,90 \pm 0,86	12,30 \pm 0,75*	13,20 \pm 0,57*	7,6–9,5
гемоглобин, г/л	171,20 \pm 25,46	195,60 \pm 12,35	261,60 \pm 14,57*	264,80 \pm 14,15*	150–180
гематокрит, %	37,70 \pm 4,47	43,30 \pm 2,65	57,40 \pm 1,93*	59,80 \pm 3,30*	36–54

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

Примечание. ПИ – внутривлабораторный референтный интервал.

* Статистически значимые отличия (ANOVA, post-hoc Тьюки) в сравнении с группой животных, получавшей контрольное вещество.

Определение «нежелательности» выявленных изменений. Использование принципа Weight-of-Evidence

Фармакодинамическая приемлемость эффекта.

Некоторые эффекты, наблюдаемые у животного, могут быть приемлемыми с фармакодинамической точки зрения. Самый простой пример – гипогликемия при введении инсулина здоровым животным. Сюда также можно отнести отложение железа в органах и тканях на фоне внутривенного введения коллоидного железа лабораторным животным или увеличение показателей эритропоэза, гипертрофию селезенки, экстрамедуллярный гемопоэз на фоне введения эритропоэтинов (табл. 3).

В примере, представленном в таблице 3, наблюдается дозозависимое увеличение доли ретикулоцитов, абсолютного количества эритроцитов, гемоглобина и гематокрита. Статистическая значимость этих изменений в сравнении с контрольной группой достигается при применении средней и высокой доз препарата. Учитывая известные фармакодинамические свойства препарата дарбэпоэтин, данные эффекты можно классифицировать как связанные с первичной фармакодинамикой. Примечательно, что увеличение указанных показателей отмечается уже при применении низкой дозы, однако выход за пределы референтного интервала наблюдается только при использовании средней и высокой доз, что может свидетельствовать о переходе от ожидаемого желательного терапевтического эффекта к нежелательным изменениям.

Стоит отметить, что это достаточно условная граница, и представляется весьма сложным, опираясь в том числе на референтные интервалы, провести границу между приемлемым и чрезмерным фармакодинамическим эффектом, при условии, что в токсикологическом

исследовании используются здоровые животные с нормальным уровнем всех показателей, а фармакологическое действие препарата изучается на животных с модельной патологией. Порог может сильно различаться в зависимости от класса препарата, характера фармакодинамических эффектов и терапевтической широты.

Возможность адаптационной реакции организма на воздействие. Выявленные морфологические изменения могут являться адаптивными (компенсаторными) реакциями организма. При длительном ингаляционном введении у животных может наблюдаться ряд характерных изменений: плоскоклеточная метаплазия гортани, гиперплазия и метаплазия клеток слизистой носовых ходов, а также увеличение количества альвеолярных макрофагов [25]. При оценке подобных эффектов необходимо учитывать их выраженность. Так, фокальная плоскоклеточная метаплазия гортани минимальной или легкой степени может рассматриваться как адаптивная реакция. В то же время диффузную метаплазию умеренной или тяжелой степени, затрагивающую несколько уровней гортани, следует классифицировать как нежелательный эффект [26].

Еще одним примером часто встречающейся адаптивной реакции может являться гепатоцеллюлярная гипертрофия и увеличение массы печени как ответ на введение исследуемого объекта, вызывающего индукцию цитохрома P450. Считается, что при минимальной и легкой степени тяжести гепатоцеллюлярной гипертрофии без каких-либо сопутствующих некротических изменений и повышения активности трансаминаз в сыворотке крови данные состояния не следует считать нежелательными. С другой стороны, гепатоцеллюлярная гипертрофия с сопутствующим гепатоцеллюлярным некрозом и выраженной активностью печеночных ферментов может считаться нежелательным эффектом [27].

Оценка изолированности эффекта. При оценке нежелательных эффектов требуется комплексный анализ взаимосвязанных параметров. Для иллюстрации этого принципа можно рассмотреть батарею тестов Ирвина и функциональные наблюдательные тесты (Functional observation battery, FOB), которые используются для оценки фармакологической безопасности воздействия на центральную нервную систему. Эти методики включают около 40 различных тестов, сгруппированных по оценке двигательной

активности, координации движений, сенсорных рефлексов и других показателей [28].

Важно отметить, что любое изменение отдельного параметра должно подтверждаться соответствующими изменениями других показателей в той же группе параметров. Иными словами, выявленный эффект не может быть изолированным – он должен иметь подтверждение в виде согласованных изменений в связанных показателях, что позволяет более достоверно интерпретировать полученные результаты.

Анализ обратимости морфологических изменений. При оценке нежелательности выявленных изменений целесообразно учитывать и их обратимость. С этой целью в дизайн исследования включают дополнительное количество животных, оценку основных показателей которых проводят после периода отмены введения исследуемого лекарственного препарата.

По способности к регенерации ткани принято разделять на лабильные (состоящие из непрерывно делящихся клеток, например эпителий кишечника), стабильные (состоящие из клеток, находящихся в состоянии покоя, например паренхиматозные клетки печени, почек, поджелудочной железы) и статические (состоящие из неделящихся клеток, например нейроны/миоциты). Лабильные ткани обладают значительным потенциалом восстановления через пролиферацию идентичных клеток при сохранном внеклеточном матриксе, в то время как стабильные ткани демонстрируют более ограниченную способность к регенерации, существенно зависящую от целостности матрикса. При повреждении стромального каркаса происходит неправильное распределение регенерированных паренхиматозных клеток, что приводит к неэффективной репарации, а статические ткани при повреждении полностью утрачивают способность к регенерации, замещаясь соединительной тканью.

С точки зрения дальнейшего клинического применения особое внимание следует уделять тканям со сниженным потенциалом восстановления и репарации. При оценке нежелательности выявленных изменений критически важно анализировать их обратимость и естественную способность к регенерации. Некоторые изменения обладают высокой способностью к восстановлению [29] и при надлежащем обосновании могут не учитываться при определении NOAEL.

Таким образом, в данном разделе проанализированы основные аспекты, которые следует

учитывать при оценке нежелательности выявленных изменений. Представленный перечень не является исчерпывающим. Необходимо принимать во внимание временный характер эффектов, их возможную видоспецифичность, соответствие ожидаемым изменениям для исследуемого класса соединений и другие факторы [2].

Важно подчеркнуть, что итоговая оценка NOAEL должна базироваться на всестороннем анализе всех выбранных нежелательных эффектов с применением принципа весомости доказательств – Weight-of-Evidence (WoE-анализ), который позволяет оценить совокупность различных факторов и их вес с точки зрения степени влияния на органы и ткани, их функцию, потенциальные риски клинического применения.

Методологические подходы WoE-анализа при доклинической разработке лекарственных средств подробно освещены в публикации [30]. Основные этапы WoE-анализа включают в себя формулировку проблемы, сбор, оценку, взвешивание и объединение доказательств с формированием основного вывода¹² [30]. Ключевыми элементами анализа являются определение факторов риска (WoE-факторов), их оценка по степени критичности и дальнейшее взвешивание доказательств.

Применительно к стандартному токсикологическому исследованию факторы риска целесообразно выбрать на основе используемых первичных и вторичных конечных точек.

Высокая степень критичности (первичные конечные точки). К этой категории относятся маркеры явной токсичности, напрямую угрожающие жизнедеятельности организма или функции органов: гибель животных; клинические признаки интоксикации (судороги, угнетение дыхания и пр.); снижение массы тела более 20%; функциональные нарушения органов (например, снижение клубочковой фильтрации почек); необратимые патоморфологические изменения (некрозы, опухоли).

Умеренная степень критичности (вторичные конечные точки). Включает суррогатные маркеры токсичности, которые указывают на потенциальные риски, но требуют подтверждения первичными данными: биохимические параметры (повышение АЛТ/АСТ и проч.); гематологические сдвиги (анемия, тромбоцитопения); обратимые гистологические измене-

ния (вакуолизация гепатоцитов, гиперплазия эпителия).

Низкая степень критичности (маркеры чрезмерной фармакодинамики). К этой группе относятся эффекты, связанные с первичной фармакодинамикой изучаемого лекарственного средства: доля ретикулоцитов для эритропоэтинов (дарбэпоэтин); увеличение уровня железа в крови, отложения железа в органах и тканях (препараты железа).

Требуется отметить, что выбор WoE-факторов будет зависеть от выбранных первичных и вторичных конечных точек для каждого отдельного эксперимента. Это требует тщательного планирования эксперимента с надлежащим обоснованием объема определяемых параметров. Так, в зависимости от предполагаемого фармакологического или токсического профиля исследуемого препарата дизайн может быть дополнен специальными функциональными тестами изучения дыхательной (например, плевтизмография), центральной нервной (батарея тестов Ирвина, тесты распознавания объектов), сердечно-сосудистой (параметры ЭКГ, артериальное давление, частота сердечных сокращений) систем организма, анализом целевых маркеров органной токсичности (например, оценкой клиренса креатинина для изучения фильтрационной функции почек, половых гормонов или гормонов щитовидной железы и др.) или фармакодинамических маркеров (активность ферментов-мишеней, концентрация белков, изменение экспрессии генов и др.).

На рисунке 2 представлен пример использования WoE-анализа при выборе NOAEL для препарата дарбэпоэтин. В качестве факторов риска выбраны основные первичные и вторичные конечные точки. Во всех дозах отсутствовала гибель, картина интоксикации и выраженные гистопатологические изменения в органах и тканях, во всех дозах наблюдали развитие экстремедуллярного эритропоэза (обратимое), биологически значимое увеличение массового коэффициента селезенки, гематологических маркеров эритрогенной активности, включая долю ретикулоцитов, с выходом уровней за референтные интервалы в средней и высокой дозе. По совокупности полученных данных в качестве NOAEL целесообразно выбрать минимальную дозу, при которой выявленные фармакодинамические эффекты находятся в пределах референтных интервалов.

¹² OECD Guiding Principles and Key Elements for Establishing a Weight of Evidence for Chemical Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 311. OECD; 2019. <https://doi.org/10.1787/f11597f6-en>

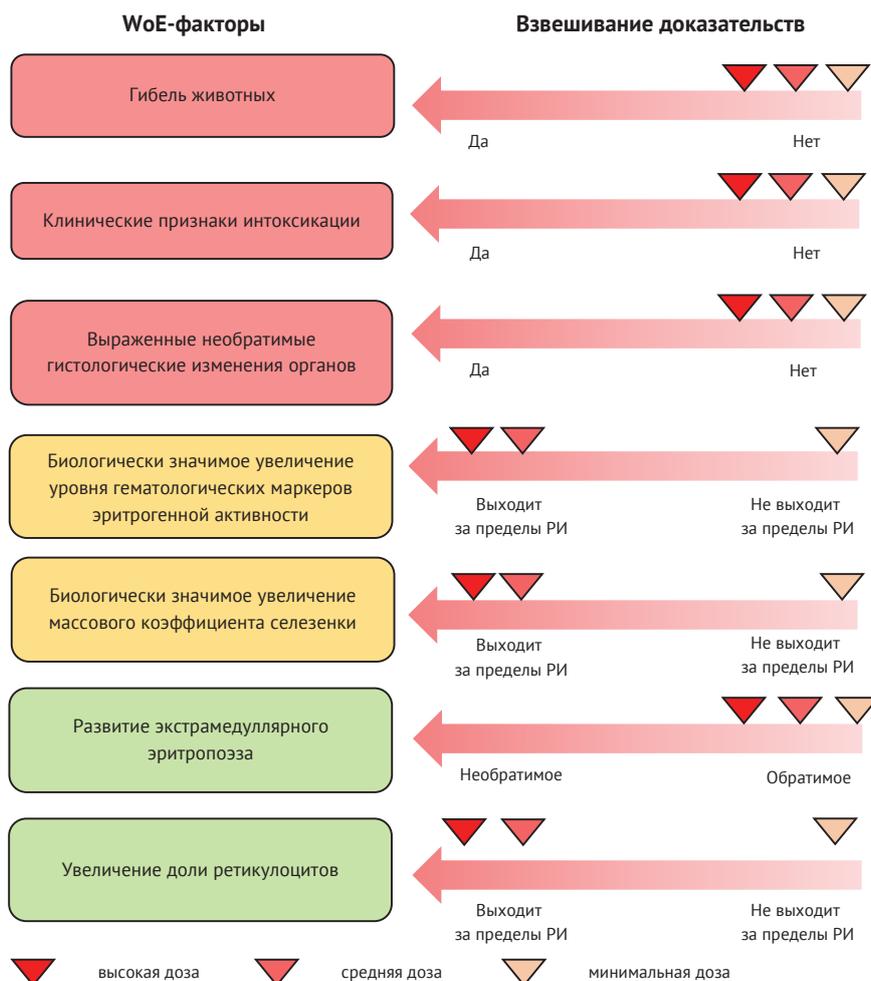


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 2. Гипотетический пример WoE-анализа выбора NOAEL на примере препарата дарбэпоэтин. Красным выделены факторы, имеющие высокую степень критичности, желтым – умеренную и зеленым – низкую

Fig. 2. A hypothetical example of Weight-of-Evidence (WoE) analysis for NOAEL selection using darbepoetin as a case study. Factors with high criticality are marked in red, moderate criticality in yellow, and low criticality in green

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доза, не вызывающая видимых нежелательных эффектов, или NOAEL, является ключевым количественным параметром доклинических исследований безопасности новых лекарственных средств. Являясь фактически нижней границей токсического диапазона, NOAEL используется для оценки широты терапевтического действия новых лекарственных средств, а также служит основой для расчета стартовой дозы в клинических исследованиях с участием человека.

Оценка нежелательности выявленных изменений является наиболее сложной методологической задачей в интерпретации данных токсикологического эксперимента. В работе предложена схема определения нежелательных эффектов, включающая три последовательных этапа: анализ взаимосвязи между наблюдаемым эффектом и введением тестируемого объекта;

оценка размера эффекта и (или) степени изменений; определение характера выявленных изменений с точки зрения их нежелательности.

Для окончательного выбора NOAEL эффективным инструментом служит подход Weight-of-Evidence (WoE-анализ), или весомости доказательств, основанный на комплексной оценке рисков. Данный метод позволяет провести всестороннюю оценку всей совокупности выявленных нежелательных эффектов с учетом выбранных первичных и вторичных конечных точек, обеспечивая более объективное и обоснованное определение NOAEL.

Внедрение данного комплексного подхода позволяет существенно повысить объективность интерпретации токсикологических данных и обеспечить более надежную оценку рисков при планировании и проведении клинических исследований лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Palazzi X, Burkhardt JE, Caplain H, Dellarco V, Fant P, Foster JR, et al. Characterizing “adversity” of pathology findings in nonclinical toxicity studies: Results from the 4th ESTP International Expert Workshop. *Toxicol Pathol.* 2016;44(6):810–24. <https://doi.org/10.1177/0192623316642527>
2. Lewis RW, Billington R, Debryune E, Gamer A, Lang B, Carpanini F. Recognition of adverse and nonadverse effects in toxicity studies. *Toxicol Pathol.* 2002;30(1):66–74. <https://doi.org/10.1080/01926230252824725>
3. Dorato MA, Engelhardt JA. The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: use, issues, and definition(s). *Regul Toxicol Pharmacol.* 2005;42(3):265–74. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.05.004>
4. Park YC, Cho MH. A new way in deciding NOAEL based on the findings from GLP-toxicity test. *Toxicol Res.* 2011;27(3):133–5. <https://doi.org/10.5487/tr.2011.27.3.133>
5. Keller DA, Juberg DR, Catlin N, Farland WH, Hess FG, Wolf DC, Doerrer NG. Identification and characterization of adverse effects in 21st century toxicology. *Toxicol Sci.* 2012;126(2):291–7. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr350>
6. Kerlin R, Bolon B, Burkhardt J, Francke S, Greaves P, Meador V, et al. Scientific and regulatory policy committee: Recommended (“best”) practices for determining, communicating, and using adverse effect data from nonclinical studies. *Toxicol Pathol.* 2016;44(2):147–62. <https://doi.org/10.1177/0192623315623265>
7. Kale VP, Bebenek I, Ghantous H, Kapeghian J, Singh BP, Thomas LJ. Practical considerations in determining adversity and the No-Observed-Adverse-Effect-Level (NOAEL) in Nonclinical Safety Studies: Challenges, perspectives and case studies. *Int J Toxicol.* 2022;41(2):143–62. <https://doi.org/10.1177/10915818211073047>
8. Енгальчева ГН, Сюбаев РД. Выбор высокой дозы для изучения общетоксического действия новых лекарственных средств. *Безопасность и риск фармакотерапии.* 2023;11(2):145–54. Engalycheva GN, Syubaev RD. High dose selection for general toxicity studies of new medicines. *Safety and Risk of Pharmacotherapy.* 2023;11(2):145–54 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-145-154>
9. Chrominski K, Magdalena T. Comparison of outlier detection methods in biomedical data, *Journal of Medical Informatics & Technologies.* 2010; 16.
10. Hothorn LA. Statistical evaluation of toxicological bioassays – A review. *Toxicol Res.* 2014;3(6):418–32. <https://doi.org/10.1039/c4tx00047a>
11. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev.* 2012;33(3):378–455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
12. Owen RA, Heywood R. Age-related variations in renal structure and function in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol.* 1986;14(2):158–67. <https://doi.org/10.1177/019262338601400203>
13. Chandra M, Riley MG, Johnson DE. Spontaneous neoplasms in aged Sprague-Dawley rats. *Arch Toxicol.* 1992;66(7):496–502. <https://doi.org/10.1007/BF01970675>
14. Poteracki J, Walsh KM. Spontaneous neoplasms in control Wistar rats: A comparison of reviews. *Toxicol Sci.* 1998;45(1):1–8. <https://doi.org/10.1006/toxs.1998.2493>
15. McInnes E. Common spontaneous and background lesions in laboratory animals: principles and practices of laboratory animal pathology for study personnel. In: McInnes E, ed. *Pathology for toxicologists.* Chennai: Wiley; 2017. P. 59–71. <https://doi.org/10.1002/9781118755174.ch4>
16. Chamanza R, Marxfeld HA, Blanco AI, Naylor SW, Bradley AE. Incidences and range of spontaneous findings in control cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) used in toxicity studies. *Toxicol Pathol.* 2010;38(4):642–57. <https://doi.org/10.1177/0192623310368981>
17. Беляева ЕВ, Рыбакова АВ, Гушин ЯА, Ваганова ДС, Коптяева КЕ, Мужикян АА и др. Патоморфологическая диагностика легких при различных методах эвтаназии лабораторных животных. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2018;(3):49–60. Belyaeva EV, Rybakova AV, Guschin YaA, Vaganova DS, Koptyaeva KE, Muzhikyan AA, et al. Pathomorphological diagnostics of lungs at various methods of euthanasia of laboratory animals. *Laboratory Animals for Science.* 2018;(3):49–60 (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/2618723X-2018-03-05>
18. Ramot Y, Ben-Eliahu S, Kagan L, Ezov N, Nyska A. Subcutaneous and intraperitoneal lipogranulomas following subcutaneous injection of olive oil in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol.* 2009;37(7):882–6. <https://doi.org/10.1177/0192623309347911>
19. He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(2):477–88. <https://doi.org/10.1080/21645515.2014.1004026>
20. Talbot SR, Biernot S, Bleich A, van Dijk RM, Ernst L, Häger C, et al. Defining body-weight reduction as a humane endpoint: a critical appraisal. *Lab Anim.* 2020;54(1):99–110. <https://doi.org/10.1177/0023677219883319>
21. Sullivan GM, Feinn R. Using effect size – or why the p value is not enough. *J Grad Med Educ.* 2012;4(3):279–82. <https://doi.org/10.4300/JGME-D-12-00156.1>
22. Carneiro CFD, Moulin TC, Macleod MR, Amaral OB. Effect size and statistical power in the rodent fear conditioning literature – A systematic review. *PLoS One.* 2018;13(4):e0196258. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196258>
23. Kobayashi A, Suzuki Y, Sugai S. Specificity of transaminase activities in the prediction of drug-induced hepatotoxicity. *J Toxicol Sci.* 2020;45(9):515–37. <https://doi.org/10.2131/jts.45.515>
24. Hall RL. Lies, damn lies, and reference intervals (or hysterical control values for clinical pathology data). *Toxicol Pathol.* 1997;25(6):647–9. <https://doi.org/10.1177/019262339702500617>
25. Burger GT, Renne RA, Sagartz JW, Ayres PH, Coggins CR, Mosberg AT, et al. Histologic changes in the respiratory tract induced by inhalation of xenobiotics: physiologic adaptation or toxicity? *Toxicol Appl Pharmacol.* 1989;101(3):521–42. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(89\)90200-7](https://doi.org/10.1016/0041-008x(89)90200-7)
26. Kaufmann W, Bader R, Ernst H, Harada T, Hardisty J, Kittel B, et al. 1st international ESTP expert workshop: “Larynx squamous metaplasia”. A re-consideration of morphologic and diagnostic approaches in rodent studies and its relevance for human assessment. *Exp Toxicol Pathol.* 2009;61(6):591–603. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.01.001>
27. Hall AP, Elcombe CR, Foster JR, Harada T, Kaufmann W, Knippel A, et al. Liver hypertrophy: a review of adaptive (adverse and non-adverse) changes – conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicol Pathol.* 2012;40(7):971–94. <https://doi.org/10.1177/0192623312448935>
28. Mathiasen JR, Moser VC. The Irwin test and Functional Observational Battery (FOB) for assessing the effects of compounds on behavior, physiology, and safety pharmacology in rodents. *Curr Protoc.* 2023;3(5):e780. <https://doi.org/10.1002/cpz1.780>
29. Perry R, Farris G, Bienvenu JG, Dean C Jr, Foley G, Mahrt C, et al. Society of Toxicologic Pathology position paper on best practices on recovery studies: the role of the anatomic pathologist. *Toxicol Pathol.* 2013;41(8):1159–69. <https://doi.org/10.1177/0192623313481513>
30. Енгальчева ГН, Сюбаев РД. WoE-анализ и ключевые факторы риска при доклинической разработке лекарственных препаратов: обзор. *Безопасность и риск фармакотерапии.* 2024;12(4):463–76. Engalycheva GN, Syubaev RD. WoE analysis and key risk factors in preclinical development of medicinal products: a review. *Safety and Risk of Pharmacotherapy.* 2024;12(4):463–76 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2024-12-4-463-476>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: К.Л. Крышень – концепция работы, сбор и систематизация информации, написание текста рукописи, формулировка заключения; Я.А. Гуцин, Н.М. Фаустова, С.В. Гущина, Ж.Ю. Устенко, В.А. Вавилова, М.В. Мирошников – участие в подготовке основного раздела рукописи; А.Е. Кательникова – работа с источниками литературы; К.Т. Султанова – редактирование текста рукописи; А.А. Матичин – редактирование текста рукописи; Я.Г. Муразов – участие в подготовке схемы определения нежелательных эффектов; М.А. Ковалева, Д.В. Шубин – критический пересмотр текста рукописи; В.Г. Макаров, М.Н. Макарова – 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. Kirill L. Kryshen – the concept of the work, the collection and systematization of information, the writing of the text of the manuscript, the formulation of conclusions. Yaroslav A. Gushchin, Natalia M. Faustova, Svetlana V. Gushchina, Zhanna Yu. Ustenko, Valeria A. Vavilova, and Mikhail V. Miroshnikov – participation in the preparation of the main section of the manuscript. Anastasiia E. Katelnikova – working with literature sources. Kira T. Sultanova – editing the text of the manuscript. Alexandr A. Matichin – editing the text of the manuscript. Iaroslav G. Murazov – participation in the preparation of scheme for determining adverse effects. Mariya A. Kovaleva, Dmitriy V. Shubin – critique of the manuscript text. Valeriy G. Makarov, Marina N. Makarova – approval of the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Крышень Кирилл Леонидович, канд. биол. наук / Kirill L. Kryshen, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>

Гуцин Ярослав Александрович / Yaroslav A. Gushchin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7656-991X>

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

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

Гущина Светлана Валерьевна / Svetlana V. Gushchina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0247-0378>

Устенко Жанна Юрьевна, канд. вет. наук / Zhanna Yu. Ustenko, Cand. Sci. (Vet.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1299-0200>

Кательникова Анастасия Евгеньевна, канд. мед. наук / Anastasiia E. Katelnikova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3203-9869>

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

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

Матичин Александр Алексеевич / Alexandr A. Matichin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7478-4942>

Вавилова Валерия Александровна / Valeria A. Vavilova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1009-3963>

Муразов Ярослав Геннадьевич, канд. биол. наук / Iaroslav G. Murazov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6573-3112>

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

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

Ковалева Мария Александровна, канд. биол. наук / Mariya A. Kovaleva, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0740-9357>

Шубин Дмитрий Валерьевич / Dmitriy V. Shubin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5127-6697>

Макаров Валерий Геннадьевич, д-р мед. наук, профессор / Valeriy G. Makarov, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>

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

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

Поступила 18.12.2024

После доработки 17.04.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Received 18 December 2024

Revised 17 April 2025

Accepted 6 June 2025



Н.М. Фаустова ✉ 
А.Е. Салопонова 
М.В. Мирошников 
М.Н. Макарова 
В.Г. Макаров 

Оценка функционального состояния органов кроветворения в токсикологических исследованиях лекарственных препаратов: обзор. Часть 1. Органы кроветворения лабораторных животных. Механизмы развития гематотоксичности

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

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

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Кровь содержит наибольшее количество активных клеток организма и одновременно является основной мишенью для потенциально токсичных веществ. Перечень биохимических и гематологических параметров, обязательных для контроля у лабораторных животных в ходе доклинических исследований (ДКИ) токсичности, содержащийся в нормативных документах Российской Федерации и международных рекомендациях, недостаточен для прогноза и оценки механизма развития лекарственно-индуцированной гематотоксичности *in vivo*. Обзор новых данных по этому вопросу и обновление перечня биомаркеров позволит расширить возможности контроля за состоянием лабораторных животных, повысить чувствительность и специфичность оценки токсического воздействия на кроветворение в ДКИ, что будет способствовать повышению безопасности лекарственных средств и эффективности терапии. Обзор состоит из двух частей.

ЦЕЛЬ. Выявление различий органов кроветворения человека и лабораторных животных для разработки рекомендаций по включению показателей для оценки гематотоксичности при проведении доклинических исследований *in vivo*.

ОБСУЖДЕНИЕ. В первой части обзора охарактеризованы органы кроветворения теплокровных млекопитающих и показаны принципиальные их различия у лабораторных животных и человека. Выделены основные механизмы развития гематотоксичности лекарственных средств: цитотоксическое воздействие на гемопоэтические клетки-предшественники; прямое повреждение зрелых клеток; косвенное повреждение клеток крови или костного мозга вследствие нежелательных иммунных реакций и изменения активности рецепторов клеточной поверхности; изменение активности ферментных систем, необходимых для нормального функционирования клеток; приведены примеры гематотоксического действия лекарственных средств. Обобщены данные по показателям клинического анализа крови 8 видов лабораторных животных: грызунов (мышь, крыса, хомяк, морская свинка) и негрызунов (кролик, макака, карликовая свинья, хорек).

ВЫВОДЫ. Особенности строения и состава тканей и органов кроветворения лабораторных животных по сравнению с человеком могут привести к существенным отличиям токсикологического профиля лекарственного средства, полученного в ДКИ. Клинический анализ крови позволяет оценить значительное количество проявлений гематотоксичности лекарственных средств, оказывающих непосредственное влияние на клетки крови и их предшественников. Однако при косвенном влиянии лекарственного средства (через ферментные системы, воздействие на клетки-предшественники, появление антител и др.) этих данных недостаточно, и для повышения прогностической ценности ДКИ необходимо использование дополнительных биомаркеров.

Ключевые слова: кровь; органы кроветворения; гематотоксичность; лабораторные животные; клинический анализ крови; показатели, грызуны; негрызуны; доклинические исследования; клиническая гематология; биомаркеры; ветеринария

Для цитирования: Фаустова Н.М., Салопонова А.Е., Мирошников М.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Оценка функционального состояния органов кроветворения в токсикологических исследованиях лекарственных препаратов: обзор. Часть 1. Органы кроветворения лабораторных животных. Механизмы развития гематотоксичности. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(3):278–288. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-278-288>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

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

Natalia M. Faustova ✉ 
Alina E. Saloponova 
Mikhail V. Miroshnikov 
Marina N. Makarova 
Valery G. Makarov 

Assessment of Functional Safety of Blood Forming Organs in Research of Toxicological Properties of Medicinal Products (Review). Part 1. Features of the Hematopoietic Organs of Laboratory Animals. Mechanisms of Hematotoxicity

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

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

ABSTRACT

INTRODUCTION. The blood contains a large quantity of active cells of the organism and it is a basic target for potentially toxic substances. The regulatory documents of the Russian Federation and international recommendations provide a list of mandatory biochemical and hematological parameters, but they are insufficient for predicting drug-induced hepatotoxicity *in vivo* during preclinical studies. A review of new data on this issue and an update of the list of biomarkers will expand the capabilities for monitoring the condition of laboratory animals, enhance the sensitivity and specificity of assessing toxic effects on hematopoiesis in preclinical studies, and thereby contribute to improving the safety of medicinal products and the effectiveness of therapy. The review consists of two parts.

AIM. The study aimed to identify the differences between the hematopoietic organs of humans and laboratory animals in order to develop recommendations for preclinical studies using animal blood as a biomaterial.

DISCUSSION. The first part of the review shows the characteristics of the hematopoietic organs of humans and laboratory animals, indicating their characteristics compared to humans. It is discussed of mechanisms of hemotoxicity of various medicinal products. The paper discusses the mechanisms of development of hematotoxicity of drugs, among which 4 main ones can be distinguished: cytotoxic effects on hematopoietic progenitor cells; direct damage to mature cells; indirect damage to blood or bone marrow cells due to undesirable immune reactions against and changes in the activity of cell surface receptors; change in the activity of enzyme systems necessary for the normal functioning of cells. Data on clinical blood analysis parameters of 8 species of laboratory animals: rodents (mouse, rat, hamster, guinea pig) and non-rodents (rabbit, macaque, pygmy pig, ferret) are summarized.

CONCLUSIONS. Some features in the structure and function of the hematopoietic organs compared to humans can lead to significant differences in the toxicological profile of the drug. It should be noted that a clinical blood test allows us to assess a significant number of manifestations of hematotoxicity of drugs that directly affect blood cells and their precursors. With an indirect effect of the medicinal product

(through enzyme systems, effect on progenitor cells, appearance of antibodies, etc.), these data are insufficient and the use of additional markers is necessary in order to increase the predictive value of preclinical studies and the comparability of data with clinical studies.

Keywords: blood; hematopoietic organs; hematotoxicity; developmental mechanisms; laboratory animals; parameters, rodents; non-rodents; preclinical studies; clinical hematology; biomarkers; veterinary science; hematologic tests; blood cells; hematopoietic stem cells

For citation: Faustova N.M., Saloponova A.E., Miroshnikov M.V., Makarova M.N., Makarov V.G. Assessment of functional safety of blood forming organs in research of toxicological properties of medicinal products (Review). Part 1. Features of the hematopoietic organs of laboratory animals. Mechanisms of hematotoxicity. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(3):278–288. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-278-288>

Funding. The study was performed without external funding.

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

ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с требованиями к разработке лекарственных средств в ходе доклинических исследований (ДКИ) обязательным является изучение не только эффективности лекарственных средств (ЛС), но и их общетоксических свойств и специфической токсичности, включая иммунотоксичность, аллергенность, репродуктивную токсичность, тератогенность, эмбриотоксичность, прогнозом канцерогенность¹. В нормативных документах Российской Федерации, международных рекомендациях, в протоколах Организации экономического сотрудничества и развития (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) приводится перечень биохимических и гематологических параметров, на основании которых делается вывод о безопасности или токсичности тестируемого препарата².

Одной из причин высокой стоимости разработки новых ЛС является высокий вынужден-

ный отсев препаратов-кандидатов из-за токсичности, выявляемой на поздних этапах ДКИ [1, 2]. Чтобы снизить стоимость и сократить сроки разработки лекарственных препаратов, важно как можно раньше выявить потенциально токсичные соединения. Для оценки токсичности на ранних этапах исследований фармацевтические компании все чаще включают в программу ДКИ помимо обязательных (клинический анализ крови, биохимический анализ с определением концентрации глюкозы, общего холестерина, триглицеридов, мочевины, креатинина, общего белка, альбуминов, билирубина и ряда ферментов) исследования с использованием дополнительных биомаркеров³ [3].

В ряде источников литературы указано, что при оценке токсичности и фармацевтической безопасности ЛС для крови, органов кроветворения, сердечно-сосудистой системы

¹ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

Приказ Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 06.03.2018 № 101 «Об утверждении правил проведения доклинического исследования лекарственного средства для ветеринарного применения, клинического исследования лекарственного препарата для ветеринарного применения, исследования биоэквивалентности лекарственного препарата для ветеринарного применения».

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

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

ГОСТ 32637-2020. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Повторное исследование пероральной токсичности на грызунах: 90-дневное.

ГОСТ Р 56697-2015. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Изучение токсичности у негрызунов при пероральном многократном введении в течение 90 дней.

ГОСТ 32383-2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Изучение хронической токсичности при ингаляционном поступлении.

ГОСТ 32437-2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Изучение хронической токсичности при кожном поступлении.

ГОСТ 32519-2013. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Изучение хронической токсичности при внутрижелудочном поступлении.

³ Биомаркер — измеряемый показатель, отражающий взаимодействие между биологической системой и фактором окружающей среды (химический, физический или биологический). Этот показатель может быть функциональным, физиологическим или биохимическим и отражает взаимодействие на клеточном или молекулярном уровне.

и желудочно-кишечного тракта отмечено наибольшее совпадение между результатами ДКИ и клинических исследований (КИ) [4–6]. Применение биомаркеров для оценки функционального состояния органов кроветворения одновременно с анализом токсических эффектов или механизмов для оценки риска применения препарата-кандидата позволит обеспечить более рациональное использование животных в ДКИ [6, 7].

Кровь представляет собой биоматериал, который взаимодействует с каждой живой клеткой, содержит наибольшее количество активных клеток организма и одновременно является одной из основных мишеней для потенциально токсичных веществ [6]. Способность быстро и эффективно обнаруживать и измерять индуцированное таким веществом повреждение клеток крови позволит своевременно принять меры для минимизации ущерба, причиненного в том числе лекарственными средствами.

Использование биомаркеров в ДКИ имеет несколько ключевых преимуществ по сравнению с традиционными методами, включающими клиническое наблюдение и стандартные лабораторные тесты без использования специфичных биомаркеров:

- раннее обнаружение токсичности: оценка потенциальной токсичности препаратов для системы кроветворения;
- мониторинг безопасности: выявление нежелательного влияния на систему кроветворения, в том числе проявлений миелосупрессии, цитотоксичности, иммуносупрессии;
- прогностическая ценность: оценка вероятности развития нежелательных реакций или неэффективности лечения у отдельных пациентов;
- оценка первичной и вторичной фармакодинамики: оценка действия препарата на целевые/нецелевые мишени.

Для выбора оптимальных биомаркеров для ДКИ необходимо иметь представление о биологической природе измеряемого показателя, а также особенностях гемопоэза у человека и животных и механизмах развития гематотоксичности.

Цель работы – выявление различий органов кроветворения человека и лабораторных животных для разработки рекомендаций проведения доклинических исследований с использованием крови животных как биоматериала. Задачами являлись систематизация и анализ имеющихся

методов оценки функционального состояния кроветворения в ходе токсикологических ДКИ. Представленный обзор состоит из двух частей.

Поиск данных литературы осуществляли в базе данных PubMed и поисковой системе Google Scholar по состоянию на 22.01.2025. В приоритете были статьи, опубликованные за последние 10 лет.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Общая характеристика органов кроветворения человека и животных

Органы кроветворения разделяют на две группы: эмбриональные кроветворные органы (желточный мешок, фетальная печень, селезенка, костный мозг) и органы кроветворения, функционирующие после рождения (красный костный мозг, тимус)⁴. При сопоставлении строения органов кроветворения лабораторных животных и человека необходимо отметить различия по следующим признакам (табл. 1): размер клеток и соотношение типов клеток (например, кроветворных и жировых клеток в красном костном мозге); красной и белой пульпы селезенки; сроки развития и инволюции тимуса; типы лимфатических узлов. Несмотря на несомненное сходство, различия в строении тканей и органов кроветворения по сравнению с человеком могут привести к существенным отличиям токсикологического профиля ЛС, полученного в ДКИ и клинических исследованиях (КИ), поэтому адекватный выбор релевантного вида животных и выбор биомаркеров является залогом информативности проведенного ДКИ и трансляции его результатов на последующие КИ [8].

Регуляция кроветворения обеспечивается многоуровневыми механизмами поддержания динамического равновесия между процессами кровообразования и кроверазрушения по принципу обратной связи. В регуляции процессов гемопоэза принимают участие различные сигнальные молекулы, в первую очередь цитокины, обеспечивая разнообразные местные и системные биологические эффекты, взаимосвязь между кроветворной, иммунной, эндокринной и нервной системами при развитии защитных реакций организма, пролиферацию, дифференцировку и функционирование всех типов клеток. К цитокинам относят колониестимулирующие факторы роста, интерлейкины, хемокины, интерфероны, трансформирующие факторы роста, фактор некроза опухолей [9, 10]. Однако большинство из этих молекул являются также биомаркерами процессов воспаления, гепатотоксичности, кардиотоксичности,

⁴ Липунова ЕА, Скоркина МЮ. Система красной крови: Сравнительная физиология. Белгород: Изд-во БелГУ; 2004.

Таблица 1. Органы кроветворения и иммунопоэза

Table 1. Organs of hematopoiesis and immunopoiesis

Орган кроветворения	Общие сведения	Характеристика органа у человека	Особенности, характерные для лабораторных животных	Источник
Красный костный мозг (ККМ)	Центральный орган гемопоэза, иммунопоэза и миелопоэза, образование предшественников Т-лимфоцитов, антиген-независимая дифференцировка В-лимфоцитов	Находится в эпифизах трубчатых костей, в губчатом веществе плоских костей, в лопатках, грудины, позвонках, костях черепа. У новорожденного ККМ занимает все костномозговые полости. У ребенка до 10–12 лет имеется только ККМ, а к 20–25 годам жировая ткань (желтый костный мозг) полностью заполняет костномозговые полости диафизов длинных трубчатых костей. К 30 годам соотношение желтого и кроветворного ККМ достигает 50:50, к 70 годам – 70:30	<u>Мыши, кролики, карликовые свиньи</u> : ККМ содержит меньшее количество кроветворных клеток и имеет более высокое содержание жировых клеток, чем у человека. <u>Собаки, кошки</u> : ККМ содержит больше кроветворных, чем жировых клеток	[9]
Тимус (вилочковая железа)	Центральный орган лимфопоэза и иммуногенеза. Дифференцировка Т-лимфоцитов. В тимусе вырабатываются гормоны: тимозин, тимулин, тимопоэтин, инсулиноподобный фактор роста 1	Расположен в верхнем отделе грудной клетки, состоит из двух долей. У человека максимальное развитие характерно для раннего детского возраста, от 3 до 18 лет – стабилизация массы. После 20 лет происходит возрастная инволюция тимуса. К 50–60 годам масса органа уменьшается примерно в 2–3 раза и сопровождается морфологическими изменениями (увеличение доли жировой и соединительной ткани, сокращением эпителиальной паренхимы и лимфоидного компонента)	<u>Мыши</u> : наличие двух тимусов (в грудной клетке и в шейном отделе); инволюция после 2,5 мес. <u>Белые крысы</u> : рост тимуса до 5 мес., возрастная инволюция – после 6 мес., со 2-го года жизни – ускоренная инволюция. <u>Кролики</u> : рост тимуса до 5–6 мес. после 3-х лет начинается инволюция тимуса; отмечается высокая зависимость морфологии органов иммунной системы от условий существования. Ранняя инволюция наступает при малой подвижности животного, голодании, гипоксии. <u>Собаки, кошки</u> : тимус небольших размеров, инволюция начинается после 5–6 мес., редуцируется к 2–3 годам. <u>Свиньи</u> : сильно развит, редуцируется к 2–3 годам	[12–15]
Селезенка	Периферический орган иммунной системы Функции: 1) антигензависимая дифференцировка лимфоцитов; 2) выработка антител к веществам, угнетающим эритропоэз в ККМ; 3) элиминация из кровотока и разрушение старых и поврежденных эритроцитов и тромбоцитов; 4) депонирование крови и накопление тромбоцитов	Селезенка расположена в левой подвздошной области, параллельно большой кривизне желудка, под ребрами с левой стороны. В селезенке различают белую и красную пульпу. Красная пульпа (около 75% объема) состоит из ретикулярной ткани с клеточными элементами крови и кровеносными сосудами. Характеристики параметров белой и красной пульпы зависят от миграционных свойств иммунокомпетентных клеток и степени активности иммунных процессов. У взрослых практически не участвует в кроветворении	Морфофункциональные типы селезенки млекопитающих на основе гистиометрических индексов капсулы, белой пульпы: 1) защитного типа (<u>кролики, суслики, сурки</u>); 2) депонирующего типа (<u>свиньи, лошади</u>); 3) смешанного типа (<u>козы, собаки, лисицы, кошки и хорьки</u>). Не выявлено достоверных отличий в морфологии красной пульпы селезенки различных групп млекопитающих. Сохраняется значительная роль органа в кроветворении у взрослых животных, у грызунов – на протяжении всей жизни	[9, 16–19]
Лимфатические узлы	Периферический орган лимфопоэза. Основная функция – защитная: 1) пролиферация (клонирование) и дифференцировка Т- и В-лимфоцитов в эффекторные клетки; 2) образование Т- и В-клеток памяти	Лимфатические узлы – образования округлой, овальной, бобовидной, реже лентовидной формы размерами от 0,5 до 50 мм, располагаются группами на путях следования лимфатических сосудов от органов и тканей к лимфатическим протокам и лимфатическим стволам	У животных различают несколько типов лимфатических узлов: 1) концентрированный тип (<u>кролики</u>) – немногочисленные, крупные лимфоузлы; 2) дисперсный тип (<u>лошади</u>) – большое количество мелких лимфоузлов, расположенных пакетами; 3) смешанный тип (<u>свиньи</u>)	[20]

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Орган кроветворения	Общие сведения	Характеристика органа у человека	Особенности, характерные для лабораторных животных	Источник
Небные миндалины	Основные функции: 1) обеспечение организма иммунокомпетентными клетками через лимфатическую систему; 2) защита верхних дыхательных путей от инфекций; 3) формирование микробной флоры полости рта и носоглотки; 4) синтез секреторного IgA, интерферона, в меньшей степени IgM, IgG	Небные миндалины – скопление лимфоидной ткани, расположенное по обе стороны от входа в глотку. Между миндалинами и тимусом существует функциональная связь – удаление миндалин способствует ранней инволюции тимуса	Типы миндалин: 1) парные небные (жвачные, однокопытные, хищные животные, человек; у большинства всеядных отсутствуют); 2) непарная мягкого неба (однокопытные и всеядные); 3) околонадгортанная (всеядные и мелкие жвачные); 4) язычная и глоточная (все виды млекопитающих)	[15, 21, 22]
Пейеровы бляшки кишечника	Участвуют в формировании иммунного ответа, в том числе в развитии аллергии на пищевые аллергены, в созревании Т- и В-лимфоцитов	Лимфоидная ткань тонкого кишечника в виде узелковых скоплений ассоциирована со слизистыми покровами, контактирует с содержанием желудочно-кишечного тракта (микрофлора, паразиты, токсины и др.)	Пейеровы бляшки у разных видов млекопитающих имеют сходное строение, но могут варьировать по размеру, количеству фолликулов и составу клеток	[23, 24]

Таблица составлена авторами. Перевод опубликован на сайте журнала. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-278-288-annex/>
The table is prepared by the authors. See the English version at the journal website. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-278-288-annex>

васкулотоксичности и др., их экспрессия связана с вовлечением многих органов, что не позволяет признать их специфичными для оценки гематотоксичности ЛС. Кроме того, для них характерны короткие периоды полувыведения из крови и очень низкие исходные уровни, что определяет сложность их применения в качестве биомаркеров фармацевтической безопасности [10]. Взаимосвязь между изменениями уровней цитокинов и развитием функциональных проявлений гематотоксичности также является недостаточно изученной [10, 11]. Примеры ЛС, проявляющих гематотоксичность, представлены в *таблице 2*.

Необходимо отметить, что некоторые ЛС могут вызывать развитие вторичных (ятрогенных) заболеваний, опасность которых выше, чем исходного заболевания [25]. В связи с этим нельзя недооценивать роль ДКИ и важность адекватно подобранного перечня оцениваемых показателей в ходе их проведения.

Клинический анализ крови

Основным методом ДКИ, используемым при изучении токсичности ЛС, является клинический

анализ крови с оценкой некоторых дополнительных показателей⁵. Биомаркеры кроветворения, которые могут быть использованы в ДКИ, можно разделить на следующие группы:

- количество клеток крови (эритроцитов, ретикулоцитов, лейкоцитов, тромбоцитов), появление клеток-бластов может предоставить информацию о влиянии ЛС на образование и разрушение клеток крови, гемопоэз в целом;
- морфология клеток крови: оценка морфологических изменений клеток крови, таких как аномалии формы, размера, наличие включений в цитоплазме клеток (активированные лимфоциты; дегенеративные формы нейтрофилов – токсическая зернистость или вакуолизация цитоплазмы, пикноз ядер; наличие микроядер в эритроцитах) может указывать на потенциальную токсичность препаратов для системы кроветворения;
- гены и белки: измерение уровня экспрессии определенных генов или белков, связанных с системой кроветворения, может предоставить данные о механизме действия

⁵ Решение Коллегии ЕЭК от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов». Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

Таблица 2. Примеры лекарственных средств, проявляющих гематотоксичность

Table 2. Examples of drugs exhibiting hematotoxicity

Механизм развития токсического действия	Лекарственный препарат	Воздействие	Источник
Цитотоксическое воздействие на гемопоэтические клетки-предшественники	Линезолид (антибиотик)	Ингибирование синтеза митохондриального белка => развитие миелосупрессии	[25]
	Хлорамфеникол (антибиотик)	Развитие миелосупрессии или апластической анемии (механизм неизвестен)	[25]
	Пиметидин, фамотидин, ранитидин (блокаторы H ₂ -гистаминовых рецепторов)	Прямое поражение клеток – предшественников миелопоэза	[27]
	Линдан (противопаразитарное средство)	Цитотоксическое действие на гемопоэтические клетки-предшественники => некроз => миелосупрессия	[29]
	Интерферон альфа	Подавляющее действие на плюрипотентные клетки-предшественники => лейкопения, тромбоцитопения	[31]
Прямое повреждение зрелых клеток	Клозапин (антипсихотическое средство)	Глутатион-индуцированный апоптоз и вторичный оксидативный стресс из-за истощения депо аденозинтрифосфорной кислоты => апоптоз нейтрофилов	[27]
Косвенное повреждение клеток крови или костного мозга	Цефалоспорины (цефтриаксон, цефтазидим); пенициллины (пиперацillin); пробенецид; ибупрофен; сульфонамиды, хинин; нестероидные противовоспалительные средства	Лекарственное средство или его метаболит связываются с некоторыми белками мембраны эритроцитов, образуются антитела (IgM и IgG типов) против комплекса, что активирует систему комплемента и приводит к внутрисосудистому гемолизу и развитию анемии	[25, 30]
	Метилдопа (гипотензивное средство)	Изменение структуры мембран эритроцитов => организм воспринимает их как чужеродные элементы => появление антител к эритроцитам	[25, 30]
	Паклитаксел (противоопухолевый препарат)	Изменение микроокружения костного мозга => снижение чувствительности поздних эритроидных предшественников к эритропоэтину => истощение эритроидных предшественников во время позднего эритропоэза	[29]
	Рибавирин (противовирусное средство)	Пассивный гемолиз с высвобождением гема => анемия	[28, 31]
Влияние на ферментные системы	Ацетилсалициловая кислота; неселективные нестероидные противовоспалительные средства, ингибирующие активность циклооксигеназы-1; препараты золота	Необратимое ингибирование циклооксигеназы-1 => блок синтеза тромбоксана A ₂ и подавление агрегации тромбоцитов	[25]

Таблица составлена авторами. Перевод опубликован на сайте журнала. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-278-288-annex/>
 The table is prepared by the authors. See the English version at the journal website. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-278-288-annex>

препаратов и их влиянии на целевые/нецелевые мишени;

- эндогенные метаболиты: данные по количеству веществ с молекулярной массой меньше 1000 Да, например катехоламинов, аминокислот, глюкозы, лактата, пирувата и др., используются для оценки влияния препаратов на метаболические пути.

При изучении общетоксического действия в первую очередь обращают внимание на следующие гематологические показатели: количество

гемоглобина (HGB), эритроцитов (RBC), лейкоцитов (WBC), тромбоцитов (PLT), гематокрит (HCT), тромбоцит (PCT), средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC). Также необходим дифференциальный подсчет по видам лейкоцитов, так как при содержании общего количества этих клеток в пределах нормы изменения в лейкоцитарной формуле могут указывать, например, на снижение активности иммунной

системы, на протекание хронических процессов в организме [32]. Такие показатели, как средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроцитах и средняя концентрация гемоглобина в эритроците, будут полезны для уточнения вида и причин развития анемии в случае ее диагностики у лабораторных животных в ходе ДКИ.

Референтные интервалы показателей клинического анализа крови различных видов животных представлены в ряде публикаций (табл. 3 «Референтные значения показателей общего анализа крови лабораторных животных (грызунов)» и табл. 4 «Референтные значения показателей общего анализа крови лабораторных животных (негрызунов)» опубликованы на сайте журнала⁶). При сравнении показателей клинического анализа крови между различными видами животных наибольшие отличия наблюдаются по количеству тромбоцитов и в соотношении различных типов лейкоцитов. Необходимо отметить, что тромбоциты мышей и крыс могут спонтанно активироваться и агрегироваться в ответ на раздражители, что приводит к образованию тромбоцитарных комков. Таким образом, подсчет тромбоцитов у крыс и мышей гематологическими анализаторами часто неточен из-за малого размера тромбоцитов грызунов [43]. Остальные показатели крови сопоставимы между собой независимо от пола животного. Более подробные описания различий и сходства форменных элементов крови у лабораторных грызунов и человека представлены в работах [33, 36, 43].

Интерпретация основных гематологических показателей в ДКИ имеет ряд особенностей.

- Дизайн большинства ДКИ предусматривает наличие интактной и (или) контрольной группы животных. Сопоставление изменений показателей клинического анализа крови, полученного для групп животных, получавших лекарственный препарат, проводят по отношению к группе интактных животных. Однако для корректной интерпретации данных важны не столько статистически значимые изменения показателей, сколько клинически значимые изменения, выходящие за пределы референтных значений. В этом случае полученные значения необходимо сравнивать с референтными интервалами для соответствующего вида животных.
- При проведении длительных экспериментов по хронической токсичности (6 мес. и более) необходимо сравнивать полученные

гематологические показатели при обследовании интактных (или контрольных) и подопытных животных с референтными интервалами с учетом возрастных норм выбранного вида животных.

- Изолированные статистически значимые изменения одного из показателей могут носить случайный (спонтанный) характер и не являться последствием воздействия лекарственных средств. Оценить клиническую значимость таких изменений возможно только при сопоставлении результатов всех исследований для данного животного (биохимического и гистологического).
- Необходимо учитывать, что существует естественное суточное изменение общего количества лейкоцитов, например, для кроликов самые низкие показатели наблюдаются во второй половине дня [43]. Поэтому необходимо при планировании эксперимента проводить забор крови у животных примерно в одно и то же время, так как обычно в ходе ДКИ проводят оценку состава крови не однократно, а в динамике, и осуществляют забор крови после последнего введения препарата и через определенный промежуток времени после его отмены (длительность исследования зависит от предполагаемой длительности приема препарата у человека).

Также важно учитывать преаналитические требования к работе с кровью (забор крови, подготовка к анализу). Их задача – обеспечить сохранность компонентов биологического материала, взятого для исследования, и минимизировать влияние различных факторов на результаты анализа.

Определяемые с помощью клинического анализа крови параметры и изучение особенностей морфологии клеток позволяют оценить значительное количество нежелательных явлений при действии ЛС, оказывающих непосредственное влияние на клетки крови и их предшественников. Однако при развитии гематотоксичности вследствие косвенного влияния лекарственного средства этих данных недостаточно и необходимо применение дополнительных маркеров с целью повышения прогностической ценности ДКИ и сопоставимости данных с КИ. Дополнительным маркером оценки гематотоксичности ЛС, которые могут быть использованы в ходе рутинных токсикологических исследований, посвящена вторая часть обзора.

⁶ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-278-288-annex>

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нормальное функционирование системы кроветворения представляет собой сбалансированную структуру, чувствительную к повреждениям. Фармацевтические препараты как вещества чужеродного происхождения могут вызывать нарушения в работе этой системы. К основным механизмам развития гематотоксичности, понимание которых значительно расширилось за последнее десятилетие, можно отнести следующие: 1) цитотоксическое воздействие на гемопоэтические клетки-предшественники; 2) прямое повреждение зрелых клеток; 3) косвенное повреждение клеток крови и (или) костного мозга вследствие нежелательных иммунных реакций и изменения активности рецепторов клеточной поверхности; 4) изменение активности ферментных систем, необходимых для нормального функционирования клеток.

Для корректной интерпретации данных, полученных при оценке фармакологической безопасности лекарственных средств в ходе ДКИ, необходимо учитывать некоторые различия в строении органов кроветворения у человека и лабораторных животных. Основные отличия отмечены в распределении функций между костным мозгом и селезенкой, в сроках развития и инволюции тимуса. У человека во взрослом состоянии основным органом кроветворения является красный костный мозг, а селезенка

практически не участвует в этом процессе, тогда как у большинства животных сохраняется значительная роль селезенки в процессе кроветворения на протяжении всей жизни. Также необходимо отметить наличие различий в размерах и морфологии клеток, а также в соотношении типов клеток в различных тканях.

Обобщение данных по показателям клинического анализа крови восьми видов лабораторных животных: грызунов (мышь, крыса, хомяк, морская свинка) и негрызунов (кролик, макака, карликовая свинья, хорек) — показывает, что основные различия между ними характерны для количества тромбоцитов и соотношения различных типов лейкоцитов.

Клинический анализ крови, являющийся обязательным исследованием при изучении фармацевтической безопасности лекарственных средств, позволяет оценить множество проявлений гематотоксичности лекарственных средств, особенно тех, что напрямую воздействуют на клетки крови и их предшественников. Однако при косвенном влиянии лекарственного средства этих данных недостаточно и необходимо с целью повышения прогностической ценности ДКИ и сопоставимости данных с клиническими исследованиями применение дополнительных маркеров, которые будут рассмотрены во второй части обзора.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(8):711–5. <https://doi.org/10.1038/nrd1470>
- van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, Porritt M, Rewell S, O'Collins V, et al. Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med.* 2010;7(3):e1000245. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000245>
- Hoffmann D, Adler M, Vaidya VS, Rached E, Mulrane L, Gallagher WM, et al. Performance of novel kidney biomarkers in preclinical toxicity studies. *Toxicol Sci.* 2010;116(1):8–22. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq029>
- Campion S, Aubrecht J, Boekelheide K, Brewster DW, Vaidya VS, Anderson L. The current status of biomarkers for predicting toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013;9(11):1391–408. <https://doi.org/10.1517/17425255.2013.827170>
- Gwaltney-Brant S. Blood and bone marrow toxicity biomarkers. In: Gupta RC, ed. *Biomarkers in toxicology.* Academic Press; 2019. P. 361–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00021-X>
- Wallace MA, Kormos TM, Pleil JD. Blood-borne biomarkers and bioindicators for linking exposure to health effects in environmental health science. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2016;19(8):380–409. <https://doi.org/10.1080/10937404.2016.1215772>
- Pleil JD. Categorizing biomarkers of the human exposome and developing metrics for assessing environmental sustainability. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2012;15(4):264–80. <https://doi.org/10.1080/10937404.2012.672148>
- Енгальчева ГН, Сюбаев РД. Выбор релевантных видов животных для проведения доклинических исследований безопасности лекарственных средств: обзор. *Безопасность и риск фармакотерапии.* 2025;13(1):31–43. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2025-460>
- Владимирская ЕБ. Нормальное кроветворение и его регуляция. *Клиническая онкогематология.* 2015;8(2):109–19. Vladimirskaya EB. Normal hematopoiesis and its regulation. *Clinical Oncohematology.* 2015;8(2):109–19 (In Russ.). EDN: TYMYAP
- Tarrant JM. Blood cytokines as biomarkers of in vivo toxicity in preclinical safety assessment: considerations for their use. *Toxicol Sci.* 2010;117(1):4–16. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq134>
- Boehlen F, Clemetson KJ. Platelet chemokines and their receptors: What is their relevance to platelet storage and transfusion practice? *Transfus Med.* 2001;11(6):403–17. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3148.2001.00340.x>
- Terszowski G, Müller SM, Bleul CC, Blum C, Schirmbeck R, Reimann J, et al. Evidence for a functional second thymus in mice. *Science.* 2006;312(5771):284–7. <https://doi.org/10.1126/science.1123497>
- Miller J. Investigating a second thymus in mice. *Science.* 2006;312(5780):1597–8. <https://doi.org/10.1126/science.312.5780.1597c>
- Яглова НВ, Обернихин СС. Морфофункциональные изменения тимуса у потомства мышей в период полового созревания и у взрослых особей после однократного иммуностимулирующего воздействия на материнский организм в ранние сроки беременности. *Иммунология.* 2013;34(1):15–9. Yaglova NV, Obernikhin SS. Morphofunctional changes in thymic offspring of mice in the period of puberty and in adults after single immunostimulatory

- effects of the parent organism in the early stages of pregnancy. *Immunology*. 2013;34(1):15–9 (In Russ.). EDN: [PVGHB](#)
15. Ярилин АА. Возрастные изменения тимуса и Т-лимфоцитов. *Иммунология*. 2003;24(2):117. Yarilin AA. Age-matched changes in the thymus and T-lymphocytes. *Immunology*. 2003;24(2):117 (In Russ.). EDN: [OJQPV](#)
 16. Вишневская ТЯ, Абрамова ЛЛ. Морфофункциональные типы селезенки разных видов млекопитающих. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2015;(6):247–9. Vishnevskaya TYa, Abramova LL. Morphofunctional types of the spleen of different mammalian species. *Proceedings of the Orenburg State Agrarian University*. 2015;(6):247–9 (In Russ.). EDN: [VDOPBP](#)
 17. Дроздова ЛИ, Давыдова ЮА, Кундрюкова УИ. Морфология селезенки мышевидных грызунов в условно чистой экологической зоне *Аграрный вестник Урала*. 2008;(11):39. Drozdova LI, Davydova YA, Kundryukova UI. Morphology of the spleen of mice in the is conditional-pure ecological zone. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2008;(11):39 (In Russ.). EDN: [JXDUNL](#)
 18. Хасанов ББ, Султанова ДБ. Структурно-функциональные особенности становления селезенки в онтогенезе. *Достижения науки и образования*. 2022;(7):53–60. Khasanov BB, Sultanova DB. Structural and functional features of the formation of the spleen in ontogenesis. *Achievements of Science and Education*. 2022;(7):53–60 (In Russ.). EDN: [RVNQDY](#)
 19. Зайцев ВБ, Федоровская НС, Железнов ЛМ. Морфометрические особенности структуры селезенки человека. *Вестник новых медицинских технологий*. 2018;25(3):153–9. Zaitsev VB, Fedorovskaya NS, Zheleznov LM. Morphometric features of the human spleen structure. *Journal of New Medical Technologies*. 2018;25(3):153–9 (In Russ.). EDN: [OSVBTN](#)
 20. Taniguchi I, Sakurada A, Murakami G, Suzuki D, Sato M, Kohama GI. Comparative histology of lymph nodes from aged animals and humans with special reference to the proportional areas of the nodal cortex and sinus. *Ann Anat*. 2004;186(4):337–47. [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(04\)80053-0](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(04)80053-0)
 21. Аминова ГГ. Морфологическая характеристика защитных структур слизистой оболочки некоторых органов человека. *Морфология* 2013;43(2):58–63. Aminova GG. Morphological characteristic of the protective structures of the mucous membrane of some human organs. *Morphology*. 2013;43(2):58–63 (In Russ.). EDN: [PZIFRT](#)
 22. Brandtzaeg P. Immunobiology of the tonsils and adenoids. In: *Mucosal immunology*. Academic Press; 2015. P. 1985–2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00103-8>
 23. Морозова ЕН. Морфологические особенности пейеровых бляшек тонкой кишки крыс после введения циклофосфана. *GISAP. Biology, Veterinary Medicine and Agricultural Sciences*. 2013;(2):34–7. Morozova EN. Morphological features of Peyer's patches of the small intestine of rats after injection of cyclophosphamide. *GISAP. Biology, Veterinary Medicine and Agricultural Sciences*. 2013;(2):34–7 (In Russ.).
 24. Хасанов ББ. Современные представления о структурно-функциональных особенностях пейеровых бляшек. *Достижения науки и образования*. 2022;(5):78–87. Khasanov BB. Modern ideas about the structural and functional features of Peyer's plaques. *Achievements of Science and Education*. 2022;(5):78–87 (In Russ.). EDN: [LAADCU](#)
 25. Постников СС, Костылева МН, Грацианская АН, Ермилин АЕ. Лекарственная гематотоксичность. *Безопасность и риск фармакотерапии*, 2016;(3):28–35. Postnikov SS, Kostyluova MN, Gratsianskaya AN, Ermilin AE. Drug induced haematotoxicity. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2016;(3):28–35. (In Russ.). EDN: [WKNPVD](#)
 26. Маджраков Г, Попхристов П, ред. *Лекарственная болезнь*. София: Медицина и физкультура; 1973. Majrakov G, Popkhrystov P, eds. *A medical disease*. Sofia: Medicine and Physical Education; 1973 (In Russ.).
 27. Остроумова ОД, Кочетков АИ, Павлеева ЕЕ, Кравченко ЕВ. Лекарственно-индуцированные нейтропения и агранулоцитоз *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2020;8(3):109–22. Ostroumova OD, Kochetkov AI, Pavleeva EE, Kravchenko EV. Drug-induced neutropenia and agranulocytosis. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2020;8(3):109–22 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2020-8-3-109-122>
 28. Soota K, Maliakkal B. Ribavirin induced hemolysis: a novel mechanism of action against chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2014;20(45):16184–90. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i45.16184>
 29. Gupta RC, ed. *Biomarkers in toxicology*. Academic Press; 2019.
 30. Остроумова ОД, Близняк АИ, Кочетков АИ, Комарова АГ. Лекарственно-индуцированная гемолитическая анемия. *Медицинский алфавит*. 2021;(1):49–56. Ostroumova OD, Bliznyuk SA, Kochetkov AI, Komarova AG. Drug-induced hemolytic anemia. *Medical Alphabet*. 2021;(1):49–56 (In Russ.). <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2021-1-49-56>
 31. Schmid M, Kreil A, Jessner W, Homoncik M, Datz C, Gangl A, et al. Suppression of haematopoiesis during therapy of chronic hepatitis C with different interferon alpha mono and combination therapy regimens. *Gut*. 2005;54(7):1014–20. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.057893>
 32. Сорокина АВ, Алексеева СВ, Еремина НВ, Дурнев АД. Опыт проведения клинико-лабораторных исследований в доклинической оценке безопасности лекарств (часть 1: гематологические исследования). *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(3):197–206. Sorokina AV, Alekseeva SV, Eremina NV, Durnev AD. Summary of clinical laboratory studies performed during preclinical safety evaluation of medicinal products (Part I: Haematological studies). *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(3):197–206 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-3-197-206>
 33. Lindstrom NM, Moore DM, Zimmerman K., Smith SA. Hematologic assessment in pet rats, mice, hamsters, and gerbils: blood sample collection and blood cell identification. *Clin Lab Med*. 2015;35(3):629–40. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.011>
 34. Кравченко ИН, Хохлова ОН, Кравченко НН, Пужалин АН, Дьяченко ИА, Мурашев АН. Гематологические показатели свободных от патогенной флоры крысы CD (Sprague Dawley) и мышей CD 1 в норме. *Биомедицина*. 2008;1(2):20–30. Kravchenko IN, Khokhlova ON, Kravchenko NN, Puzhalin AN, D'yachenko IA, Murashev AN. The hematological parameters of CD (Sprague Dawley) rats and CD 1 mice free of pathogenic flora are normal. *Biomedicine*. 2008;1(2):20–30 (In Russ.). EDN: [NTSTSH](#)
 35. Wozniak DM, Kirchoff N, Hansen-Kant K, Sogoba N, Safronetz D, Prescott J. Hematology and clinical chemistry reference ranges for laboratory-bred natal multimamate mice (*Mastomys natalensis*). *Viruses*. 2021;13(2):187. <https://doi.org/10.3390/v13020187>
 36. Мирошников МВ, Ковалева МА, Султанова КТ, Макарова МН. Вариабельность гематологических показателей крови и установление референтных интервалов в доклинических исследованиях. Сообщение 1: грызуны и кролики. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2024;(4):35–58. Miroshnikov MV, Kovaleva MA, Sultanova KT, Makarova MN. Variability of hematological blood parameters and establishment of reference intervals in preclinical studies. Part 1: rodents and rabbits. *Laboratory Animals for Science*. 2024;(4):35–58 (In Russ.). EDN: [RGGENU](#)
 37. McKeon GP, Nagamine CM, Ruby NF, Luong RH. Hematologic, serologic, and histologic profile of aged Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011;50(3):308–16. PMID: 21640024
 38. Spittler AP, Afzali MF, Bork SB, Burton LH, Radakovich LB, Seebart CA, et al. Age- and sex-associated differences in hematology and biochemistry parameters of Dunkin Hartley guinea pigs (*Cavia porcellus*). *PLoS One*. 2021;16(7):e0253794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253794>
 39. Kitagaki M, Yamaguchi M, Nakamura M, Sakurada K, Suwa T, Sasa H. Age-related changes in haematology and serum chemistry of Weiser-Maples guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Lab Anim*. 2005;39(3):321–30. <https://doi.org/10.1258/0023677054307042>
 40. Zimmerman K, Moore DM, Smith SA. Hematological assessment in pet guinea pigs (*Cavia porcellus*): Blood sample collection and blood cell identification. *Vet Clin North Am Exot Anim*. 2015;18(1):33–40. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2014.09.002>

41. Fox JG, Otto GM, Whary MT, Anderson LC, Pritchett-Corning KR, eds. *Laboratory animal medicine*. Elsevier; 2015.
42. Leineweber C, Müller E, Marschang RE. Blood reference intervals for rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from routine diagnostic samples. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 2018;46(6):393–8. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1677403>
43. Siegel A, Walton RM. Hematology and biochemistry of small mammals. In: *Ferrets, Rabbits, and Rodents*. Saunders; 2020. P. 569–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48435-0.00039-3>
44. Özkan C, Kaya A, Akgü Y. Normal values of haematological and some biochemical parameters in serum and urine of New Zealand White rabbits. *World Rabbit Sci*. 2012;20(4):253–9. <https://doi.org/10.4995/wrs.2012.1229>
45. Miura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Yamada T, Ito T, Izumi H, et al. Coagulation activity and white thrombus formation in the microminipig. *In Vivo*. 2013;27(3):357–61. PMID: 23606691
46. Kawaguchi H, Yamada T, Miura N, Takahashi Y, Yoshikawa T, Izumi H, et al. Reference values of hematological and biochemical parameters for the world smallest microminipigs. *J Vet Med Sci*. 2012;74(7):933–6. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0571>
47. Yeom SC, Cho SY, Park CG, Lee WJ. Analysis of reference interval and age-related changes in serum biochemistry and hematology in the specific pathogen free miniature pig. *Lab Anim Res*. 2012;28(4):245–53. <https://doi.org/10.5625/lar.2012.28.4.245>
48. Fudge AM. *Laboratory medicine: Avian and exotic pets*. Philadelphia: Saunders; 2000.
49. Park HK, Cho JW, Lee BS, Park H, Han JS, Yang MJ, et al. Reference values of clinical pathology parameters in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) used in preclinical studies. *Lab Anim Res*. 2016;32(2):79–86. <https://doi.org/10.5625/lar.2016.32.2.79>
50. Zeng XC, Yang CM, Pan XY, Yao YS, Pan W, Zhou C, et al. Effects of fasting on hematologic and clinical chemical values in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Med Primatol*. 2011;40(1):21–6. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2010.00444.x>
51. Andrade MC, Ribeiro CT, Silva VF, Molinaro EM, Gonçalves MA, Marques MA, et al. Biologic data of *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, and *Saimiri sciureus* used for research at the Fiocruz primate center. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(6):581–9. PMID: 15558168
52. Koo BS, Lee DH, Kang P, Jeong KJ, Lee S, Kim K, et al. Reference values of hematological, biochemical parameters in young–adult cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), and rhesus monkey (*Macaca mulatta*) anesthetized with ketamine hydrochloride. *Lab Anim Res*. 2019;35:7. <https://doi.org/10.1186/s42826-019-0006-0>
53. Wang H, Ni YY, Si W, Li YJ, Yan Y. Reference data of clinical chemistry, haematology and blood coagulation parameters in juvenile cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Vet Med*. 2012;57(5):233–8. <https://doi.org/10.17221/5953-vetmed>

Дополнительная информация. Таблицы 3, 4, перевод таблиц 1, 2 размещены на сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств». <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-278-288-annex>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Н.М. Фаустова – сбор, систематизация и обобщение данных, написание текста и оформление рукописи; А.Е. Салопонова – сбор, систематизация и обобщение данных, участие в написании текста рукописи; М.В. Мирошников – сбор и систематизация данных литературы; М.Н. Макарова – идея публикации, критический пересмотр текста рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; В.Г. Макаров – критический пересмотр текста рукописи, утверждение окончательного варианта статьи.

Additional information. Tables 3, 4 and tables 1, 2 translations are published on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-278-288-annex>

Authors' contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Natalia M. Faustova* collected, analysed and systematized literature data; drafted and designed the manuscript. *Alina E. Saloponova* collected, analysed and systematized literature data, drafted the manuscript. *Mikhail V. Miroshnikov* collected and systematized literature data. *Marina N. Makarova* conceived the study idea, critically revised the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication. *Valery G. Makarov* critically revised the manuscript, approved the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

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

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

Салопонова Алина Ериковна / **Alina E. Saloponova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3738-3442>

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

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

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

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

Макаров Валерий Геннадьевич, д-р мед. наук, профессор / **Valeriy G. Makarov**, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>

Поступила 27.02.2024

После доработки 10.04.2025

Принята к публикации 16.04.2025

Received 27 February 2025

Revised 10 April 2025

Accepted 16 April 2025



М.Л. Васютина¹ ✉ 
К.В. Лепик² 
М.С. Истомина¹ 
К.А. Левчук¹ 
А.В. Петухов¹ 
Е.В. Щелина¹,
А.Е. Ершова^{1,4} 
О.Н. Демидов^{3,4} 
Я.Г. Торопова^{1,5} 

Методы доклинической оценки эффективности противоопухолевых лекарственных средств *in vivo* (обзор)

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, 197341, Российская Федерация

² НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Рентгена, д. 12, Санкт-Петербург, 197022, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии РАН», Тихорецкий пр., д. 4, Санкт-Петербург, 194064, Российская Федерация

⁴ Научно-технологический университет «Сириус», Олимпийский просп., д. 1, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», 354340, Российская Федерация

⁵ Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, ул. Ивана Черных, д. 31–33, Санкт-Петербург, 198095, Российская Федерация

✉ Васютина Марина Львовна; vasyutina_ml@almazovcentre.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Основной риск низкой транслируемости результатов доклинических исследований препаратов для лечения онкологических заболеваний в клиническую практику базируется на сложности моделирования клинических условий в эксперименте. Всего около 5% из общего числа препаратов-кандидатов оказываются эффективными в клинических условиях, поэтому поиск новых подходов для доклинической оценки эффективности противоопухолевых лекарственных препаратов является одним из актуальных направлений в медицине.

ЦЕЛЬ. Анализ и систематизация методов, используемых в доклинических исследованиях эффективности противоопухолевых средств в условиях *in vivo*, для формирования методической поддержки при планировании экспериментальной работы с моделированием опухолевого процесса.

ОБСУЖДЕНИЕ. Рассмотрены этапы создания опухолевых моделей на животных, выбора клеточных линий, их тестирования на туморогенность и жизнеспособность. Показано, что использование систем визуализации, окраски витальными красителями, флуоресцентного и люминесцентного методов позволяет производить оценку эффективности противоопухолевых препаратов на моделях как солидных, так и гематологических опухолей. Основные разновидности опухолевых моделей на мышах представлены в виде схемы. Показано, что универсальной модели для экспериментального моделирования опухолевых заболеваний *in vivo* не существует. Особое внимание при выборе моделей и оценке их преимуществ и недостатков следует уделять сходству механизмов заболевания в модели и у человека на тканевом и молекулярном уровнях в зависимости от поставленных задач исследования.

ВЫВОДЫ. Результаты проведенного сравнительного анализа методов доклинической оценки эффективности противоопухолевых средств необходимы

для планирования экспериментальных исследований и для обеспечения достоверности получаемых результатов. Правильный выбор метода исследований позволит повысить успех трансляции экспериментальных данных в клиническую практику.

Ключевые слова: ксенографтные модели; ксенотрансплантат; *in vivo* визуализация; противоопухолевая активность; модели рака на животных; доклинические исследования

Для цитирования: Васютина М.Л., Лепик К.В., Истомина М.С., Левчук К.А., Петухов А.В., Щелина Е.В., Ершова А.Е., Демидов О.Н., Торопова Я.Г. Методы доклинической оценки эффективности противоопухолевых лекарственных средств *in vivo* (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(3):289–300. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-655>

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации («Создание новых препаратов для лечения и профилактики доксорубицин-индуцированной кардиомиопатии» № 123021000147-5).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Marina L. Vasyutina¹ ✉ 
Kirill V. Lepik² 
Maria S. Istomina¹ 
Ksenia A. Levchuk¹ 
Alexey V. Petukhov¹ 
Ekaterina V. Shchelina¹,
Alina E. Ershova^{1,4} 
Oleg N. Demidov^{3,4} 
Yana G. Toropova^{1,5} 

Methods for Preclinical Assessment of the Efficacy of Anticancer Medicines *in vivo* (Review)

¹ V.A. Almazov National Medical Research Center,
2 Akkuratov St., St Petersburg 197341, Russian Federation

² R.M. Gorbacheva Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Academician I.P. Pavlov First St Petersburg State Medical University,
12 Roentgen St., St Petersburg 197022, Russian Federation

³ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences,
4 Tikhoretsky Ave, St Petersburg 194064, Russian Federation

⁴ Sirius University of Science and Technology,
1 Olympic Ave, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region 354340,
Russian Federation

⁵ Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences,
31–33 Ivan Chernykh St., St Petersburg 198095, Russian Federation

✉ Marina L. Vasyutina; vasyutina_ml@almazovcentre.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The main risk to the clinical translatability of preclinical results for anticancer medicinal products is posed by the difficulty of simulating clinical conditions in an experimental model. With only 5% of product candidates proving clinically effective, the search for new approaches to the preclinical development of anticancer medicinal products is currently an active area of research in medicine. **AIM.** This study aimed to provide methodological support for planning experiments with modelling of neoplastic processes through analysis and classification of the methods used in preclinical studies of the efficacy of anticancer medicinal products *in vivo*.

DISCUSSION. This article reviews the development of animal tumour models and the selection of cell lines and their testing for tumorigenicity and viability on a step-by-step basis. According to the study results, imaging systems, vital staining, and fluorescence- and luminescence-based methods can be used to assess the efficacy of anticancer medicinal products in both solid tumour models and haematological malignancy models. The article presents a schematic representation of the main types of mouse cancer models. However, no single animal species is universally suitable for *in vivo* cancer modelling. Researchers selecting models and considering their advantages and disadvantages should pay special attention to the similarity

of disease mechanisms in animal models and humans at the tissue and molecular level, keeping in mind the aims of their research.

CONCLUSIONS. The results of this comparative analysis of methods for preclinical efficacy evaluation of anticancer medicinal products are essential for designing experimental studies and ensuring the reliability of the results obtained. Choosing the correct research method will increase the chances of obtaining experimental data that can be successfully translated into clinical practice.

Keywords: xenograft models; xenograft; *in vivo* imaging; antitumour activity; animal models of cancer; preclinical studies

For citation: Vasyutina M.L., Lepik K.V., Istomina M.S., Levchuk K.A., Petukhov A.V., Shchelina E.V., Ershova A.E., Demidov O.N., Toropova Ya.G. Methods for preclinical assessment of the efficacy of anticancer medicines *in vivo* (review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(3):289–300. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-655>

Funding. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Health of the Russian Federation (“Development of novel medicinal products for the prevention and treatment of doxorubicin-induced cardiomyopathy” No. 123021000147-5).

Disclosure. The authors declare no conflicts of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания характеризуются сложностью патогенеза и на разных стадиях своего развития демонстрируют ряд специфических признаков, таких как неконтролируемая пролиферация, подавление клеточной гибели, стимуляция ангиогенеза, активация инвазии и метастазирования. Поиск подходов для лечения онкологических заболеваний является одним из актуальных направлений медицины. При этом среди вновь разрабатываемых лекарственных средств всего около 5% из общего числа препаратов-кандидатов демонстрируют свою эффективность в клинических условиях [1, 2]. Основной риск низкой транслируемости противоопухолевых эффектов лекарственных препаратов в клиническую практику базируется на сложности воспроизведения злокачественного новообразования в эксперименте [3]. Исследования *in vitro* не позволяют в полной мере воспроизвести весь комплекс патогенетических звеньев, характерных для опухолевого процесса в организме [4]. Модели *in vitro* пригодны на этапе скрининга, а также для подтверждения эффективности препарата в рамках пилотных экспериментов «proof-of-concept» (т.е. проверки концепции применимости). Ключевую роль в успехе трансляции противоопухолевых инноваций в клиническую практику играет выбор релевантной модели опухолевого процесса на животных [5, 6].

Представленные в литературе методологические подходы к моделированию опухолевых процессов в эксперименте, а также методы исследования и оценки эффективности противоопухолевых лекарственных препаратов с различными механизмами действия требуют анализа их применимости и информативности.

Цель работы – анализ и систематизация методов, используемых в доклинических исследованиях эффективности противоопухолевых средств в условиях *in vivo* для формирования методической поддержки при планировании экспериментальной работы с моделированием опухолевого процесса.

В обзор включены публикации с открытым доступом в базах данных PubMed и Google Scholar на 10 октября 2024 г. В приоритете были научные статьи, опубликованные за последние 5–10 лет. Ключевыми словами для поиска являлись: ксенографтные модели; PDX (patient-derived xenograft – ксенотрансплантат, полученный от пациента); *in vivo* визуализация; противоопухолевая активность; модели рака на животных; доклинические исследования.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка опухолевых клеток для моделирования опухолевого процесса на лабораторных животных

Крупнейшие на сегодняшний день клеточные банки содержат более 1800 линий клеток человека и более 1500 клеток линий животных [7, 8]. Такое разнообразие клеточных линий позволяет подобрать наиболее валидную клеточную модель исходя из поставленных задач в рамках запланированных исследований. Основной критерий для создания релевантной модели *in vivo*: клеточная линия должна отражать основные генотипические и фенотипические характеристики опухоли, в отношении которой направлена разрабатываемая терапия. Существуют панели опухолевых линий, категоризированных не только по нозологиям, но и по генетическим особенностям, таким как мутация, на которую направлена разрабатываемая терапия, или экспрессия опухолевых неоантигенов [9–11].

Методы визуализации антителами позволяют идентифицировать поверхностные и (или) внутриклеточные онкомаркеры (иммуногистохимически [12] или при использовании проточной цитофлуометрии [13]), а затем подтверждать наличие мутаций с помощью секвенирования целевой последовательности. Для проверки соответствия клеточных линий предполагаемому генотипу существует возможность проведения STR-типирования (short tandem repeats – короткие tandemные повторы).

Высокая вероятность развития опухолевого процесса у животных характерна не для всех клеточных линий. В связи с этим на этапе планирования экспериментов целесообразно проводить анализ конкретных опухолевых линий на туморогенность, используя при этом данные научной литературы. Полученные результаты позволят повысить успешность трансфера при переходе к исследованиям *in vivo*.

Для повышения успешности моделирования опухолевого процесса у животных с помощью введения в их организм опухолевых клеток рекомендуется провести ряд следующих тестов: тесты на жизнеспособность и пролиферацию клеток, анализы миграции и инвазии, детекцию апоптоза и других типов клеточной смерти, окраску сенесцентных клеток, определение энергетического метаболизма и его изменений, оценку ангиогенеза, окислительного стресса, анализы экспрессии генов и белков ключевых сигнальных путей [14–16].

Большинство доступных к использованию тестов основаны на определении активности клеточных ферментов, скорости синтеза и количественного содержания ДНК, уровня клеточного АТФ и целостности мембран, которые являются индикаторами жизнеспособности клеток [17, 18]. Окраска витальными красителями (трипановый синий) позволяет выявить клетки с нарушением целостности мембраны. Для оценки пролиферативного потенциала проводят исследование включения ^3H тимидина с последующей оценкой суммарной включенной радиоактивности, однако метод ограничен в использовании из-за требований по радиационной безопасности [19].

Для определения жизнеспособности клеток широко используют фермент-субстратные методы с последующим колориметрическим или флуориметрическим анализом. К их числу можно отнести измерения внеклеточного уровня

цитозольного фермента лактатдегидрогеназы (LDH-тест). Также применяют тесты, основанные на превращении субстрата жизнеспособными клетками в окрашенный или флуоресцентный продукт, содержание которого прямо пропорционально количеству жизнеспособных клеток. Принцип действия этих тестов основан на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток восстанавливать соли тетразолия до водонерастворимых кристаллов пурпурного формазана, которые после растворения в органических растворителях определяют колориметрическим способом [20]. Для этой цели могут быть использованы различные соли тетразолия: 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий (МТS), 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид (ХТТ), 2-(2-метокси-4-нитропентил)-3-(4-нитропентил)-5-(2,4-дисульфопенил)-2Н-тетразолий (WST-8). Кроме того, используют проникающие сквозь клеточную мембрану ДНК-красители, имеющие флуоресценцию при связывании с нуклеиновыми кислотами для специфического окрашивания ядер: 7-аминоактиномицин D (7-AAD), пропидий йодид, DRAQ7[™] и др. [21, 22].

Ключевую роль в количественной оценке жизнеспособности индивидуальных клеток играет метод проточной цитофлуориметрии. Фенотипирование опухолевых клеток имеет особое значение для исследования противоопухолевой активности исследуемых препаратов в отношении пула опухолевых и лейкоэмических стволовых клеток [23]. Кроме того, существует подход, основанный на анализе способности одной клетки вырасти в колонию (клоногенный анализ или анализ образования колоний)¹ [24]. Для непрерывного мониторинга пролиферации клеток используют платформы, требующие специализированного оборудования: IncuCyte, Cell-IQ, Evos XL Core, ZEISS Celldiscoverer 7, Cytation 5, xCELLigence RTCA, которые позволяют в режиме реального времени визуализировать и регистрировать клеточные изменения. Для тестирования миграции опухолей и инвазии наиболее распространенным методом является Скретч-тест (scratch assay), направленный на оценку скорости зарастания дефекта монослоя клеток. Принцип данного метода заключается в создании стандартизованного повреждения монослоя, которое инициирует миграцию

¹ Croft J. Colony formation assay counting: Advancing the frontiers of cancer research. Presentation. 2018. https://www.researchgate.net/publication/328048722_Colony_formation_assay_counting_Advancing_the_frontiers_of_cancer_research

опухолевых клеток, находящихся на краю данного повреждения, в свободную сторону [25]. Более информативными методами для этих целей являются: анализ миграции клеток с помощью камеры Бойдена, миграции клеток в капиллярной камере, анализ зоны исключения клеток, миграции сфероидов и мониторинг миграции клеток в реальном времени, в том числе с помощью оборудования xCELLigence.

Моделирование опухолевого процесса на лабораторных животных

При большом количестве исследований в области экспериментального моделирования опухолевых заболеваний *in vivo* идеальной (универсальной) модели все еще не существует. Поэтому при выборе моделей необходимо оценить их особенности, достоинства и недостатки, степень пригодности для решения поставленных задач. При моделировании опухолевого процесса на животных должно быть соблюдено ключевое условие – сходство механизмов заболевания в модели и у человека на различных уровнях (в зависимости от поставленных задач – тканевой, молекулярный) [26–29].

Для моделирования злокачественных опухолей и последующей оценки эффективности исследуемых препаратов с противоопухолевым эффектом могут быть использованы животные различных видов, включая *Danio rerio* (зебрафиш) [30, 31], генетически модифицированных свиней [32–35] и нечеловекообразных приматов [36–39]. Эти модели имеют значительный потенциал в области онкологических исследований, одна-

ко классическим объектом для моделирования рака являются лабораторные мыши [40–42]. Основные разновидности опухолевых моделей на мышах представлены на рисунке 1.

С точки зрения прогностической фармакологии основными задачами при разработке и в доклинических исследованиях противоопухолевых препаратов являются [43]:

- демонстрация ингибирования патологического процесса (ингибирование опухолевого роста, влияние на отдельные патогенетические звенья опухолевого процесса);
- идентификация и валидация биомаркеров доклинической модели (путем сравнения профилей экспрессии генов первичных опухолей в ходе терапии);
- поиск комбинированных подходов к лечению злокачественных новообразований;
- исследование роли отдельных генов в развитии опухолевого процесса;
- определение механизма действия препаратов;
- анализ побочных эффектов.

Использование одной модели не позволяет отразить патогенез опухолевого процесса с учетом генетики, эпигенетики, иммунологии, гистопатологии и гетерогенности. В ходе одного исследования, связанного с разработкой и тестированием противоопухолевых препаратов, возможно использование нескольких моделей *in vitro* и *in vivo* [44, 45]. Также в некоторых случаях динамику опухолевого роста *in vivo* целесообразно оценивать с использованием

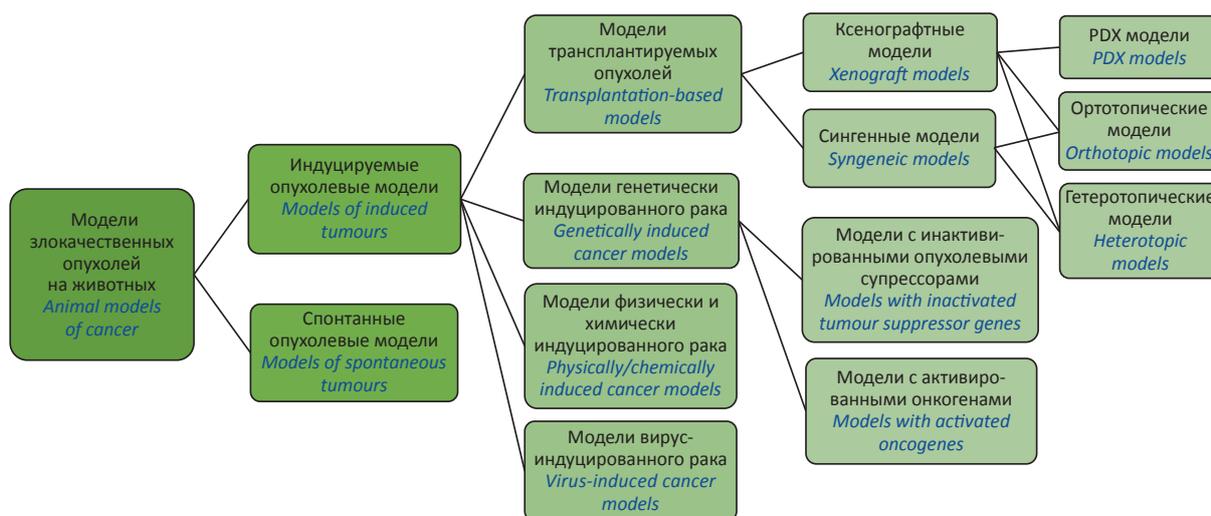


Рисунок подготовлен авторами по данным источников [26–29, 40–42] / The figure is prepared by the authors using data from [26–29, 40–42]

Рис. 1. Разновидности моделей злокачественных опухолей на животных. PDX (patient-derived xenograft) – ксенотрансплантат, полученный от пациента

Fig. 1. Variety of animal models in cancer research. PDX, patient-derived xenograft

гетеротопических моделей, а оценку продолжительности жизни – с помощью ортотопических.

Опухоли, индуцированные у лабораторных животных с помощью химического или физического воздействия, как и при спонтанном опухолевом процессе, развиваются непосредственно из клеток хозяина. Следовательно, преимуществом этих моделей в сравнении с моделями перевиваемых опухолей является бóльшая приближенность патогенеза к действительному клиническому сценарию [46]. Однако существует видовая чувствительность к химическим веществам-канцерогенам, связанная с особенностями их метаболизма у различных животных в органах-мишенях [47–49]. Поэтому наиболее часто применяют модели перевиваемых опухолей и используют для этого линии раковых клеток, тканевые или клеточные материалы, полученные от человека или лабораторных животных.

В зависимости от метода трансплантации такие модели могут быть разделены на гетеротопические и ортотопические. В качестве примера гетеротопической трансплантации можно привести подкожное или внутрибрюшинное введение опухолевых клеток молочной железы. В этом случае опухоль будет развиваться в области участка введения с образованием твердых (солидных) опухолевых узлов под кожей или асцитных изменений в брюшной полости соответственно. Процедура инокуляции в этом случае проста в техническом исполнении, что удобно для проведения скрининговых исследований противоопухолевых препаратов.

Ортотопическая трансплантация предполагает инокуляцию опухоли непосредственно в орган-мишень путем инъекции или, нередко, хирургических манипуляций. Например, модель рака мочевого пузыря у мышей была создана с использованием ортотопической трансплантации клеток карциномы мочевого пузыря человека UM-UC-3 [50]. Было показано, что хирургическая трансплантация усиливает метастатическую активность опухоли [51]. Такой подход позволяет приблизить процесс моделирования к естественному развитию опухоли с учетом формирования стромы, микроокружения, ангиогенеза и ответа на терапию.

В зависимости от происхождения трансплантируемого опухолевого материала модели на животных разделяют на сингенные и ксенографтные. Сингенные модели предполагают использование опухолевого материала, полученного от животных того же вида, на котором производится моделирование. Также необходимо средство

генетического фона для того, чтобы обеспечить максимальный уровень приживления трансплантата и снизить вероятность не связанного с онкологией иммунного ответа. Опухоли в этом случае, как правило, изначально спонтанные или химически индуцированные, поддерживаются и банкируются в виде клеточных линий и могут быть сравнительно легко привиты животным в исследовании. Однако в таких моделях отсутствует возможность изучить отдельные патогенетические механизмы, видоспецифичные для человека.

Ксенографтные модели являются наиболее часто используемыми в доклинических испытаниях. В данном случае для трансплантации используется опухолевый материал или клеточные линии, полученные от человека, что приближает такие модели к фактическим клиническим сценариям.

Следует учитывать, что в зависимости от участка трансплантации поведение опухоли может меняться: во время введения опухолевые клетки подвергаются кинетическим изменениям, часто при пассажах снижается скорость удвоения, однако ксенотрансплантированные опухоли человека сохраняют множество оригинальных морфологических и биохимических характеристик. Поэтому именно ксенографтные модели на текущий момент являются наиболее востребованными [52].

Поскольку трансплантат имеет видовую специфику, для исключения реакции «трансплантат против хозяина» животные для моделирования должны обладать определенной степенью иммунодефицита, который может быть достигнут путем медикаментозной иммуносупрессии или хирургически (удаление тимуса). Однако такие подходы трудоемки и не в полной мере поддаются валидации, в отличие от использования генетически модифицированных иммунодефицитных животных. Наиболее часто используют атимических мышей (например, линия Balb/c-Nude) и мышей с комбинированным иммунодефицитом (severe combined immunodeficiency, SCID). На фоне отсутствия определенных компонентов иммунной системы такие животные не демонстрируют отторжения трансплантируемого материала.

Использование мышей линии NSG (NOD/SCID/Gamma) позволило вывести биомоделирование на новый уровень. Тяжелый комбинированный иммунодефицит животных этой линии определяет возможность выполнения трансплантации различных типов человеческих клеток и тканей. В случае модификации этой линии и ее аналогов

(NOG hIL2, NSG-SGM) может быть учтена специфика гемопоэза и иммунитета человека, реализована экспрессия человеческих цитокинов, что позволяет в еще большей степени воссоздать вероятные иммунные ответы на терапию, например в случае применения биологически модифицированных клеточных продуктов, таких как CAR-T (chimeric antigen receptor T-cells – Т-клетки с химерным антигенным рецептором) [53].

Особый интерес для исследований представляют гуманизированные животные [54]. Взаимосвязь состояния иммунной системы организма с вероятностью канцерогенеза и с ответом на противоопухолевую терапию [55] использована в исследованиях по иммунотерапии рака [56, 57]. Гуманизированные мыши – модельный объект, особенностью которого является наличие человеческих генов, клеток или тканей, что позволяет в большей степени отобразить специфику патофизиологических процессов, характерных для человека [58].

Гуманизированные мыши с функционирующими звеньями иммунной системы человека используются для исследования роли иммунных механизмов в патогенезе рака у человека [59–61]. Для получения таких животных применяется трансплантация человеческих гематопоэтических клеток, для приживания которых необходимо предварительное подавление гемопоэза, которое достигается путем облучения иммунодефицитных мышей (irNSG, irradiated NOD/SCID/Gamma) или же путем генетической модификации (линия NBSGW) [62].

Области применения, ограничения и преимущества моделей трансплантируемых опухолей у мышей представлены в *таблице 1*.

Методы оценки эффективности противоопухолевых препаратов *in vivo*

Изменение размера опухоли является наиболее важным показателем при проведении исследований эффективности противоопухолевых препаратов. В зависимости от участка расположения опухоли для измерения ее размера могут быть использованы штангенциркуль (солидные опухоли, инокулированные подкожно) или специальные методы визуализации: компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, 3D-система оптической визуализации *in vivo* (*in vivo* imaging system, IVIS). IVIS особенно важна для оценки динамики роста гематологических опухолей (так называемых «жидких» опухолей) и ортотопически инокулированных опухолей. В ходе исследования производят мониторинг

увеличения или уменьшения размера опухоли индивидуально по каждому животному и затем групповой анализ.

Для работы с животными и получения ксенографтных моделей клеточные линии часто модифицируют для визуализации. Наиболее распространенная модификация для биолюминесцентной детекции осуществляется благодаря стабильной повышенной экспрессии люциферазы. Обычно используют два типа люцифераз: целентеразин расщепляющие или люциферин расщепляющие, иногда одновременно оба типа. Овер-экспрессия люцифераз в клеточных линиях достигается доставкой соответствующего гена под конститутивным промотором, что позволяет осуществить стабильную экспрессию. Наиболее используемым методом доставки генов люцифераз является лентивирусная трансдукция [67]. Лентивирус, несущий целевой ген, производится в immortalized клетках почки эмбриона человека HEK293T методом транзientной трансфекции трех и более плазмидных векторов, кодирующих оболочку лентивируса, систему упаковки и ген люциферазы. Лентивирусные частицы спустя 2–3 суток после трансфекции собирают в культуральную среду и концентрируют в ней для последующего заражения необходимой клеточной линии. Данные генно-инженерные модификации не влияют на свойства и чувствительность опухолевых клеток, но позволяют им расщеплять субстрат, вводимый животному, с выделением света, что детектируется оборудованием для визуализации.

Применение оптической биолюминесцентной визуализации позволяет проводить широкий спектр биологических исследований *in vivo* на мелких лабораторных животных. Поскольку большинство клеток организма не обладают собственной люминесценцией, использование данного типа визуализации позволяет достичь высокого отношения сигнал/шум и избежать фоновой автофлуоресценции ткани. Использование меток с излучением в диапазоне от красного до инфракрасного (>600 нм) является наиболее предпочтительным из-за низкого поглощения в тканях при этих длинах волн. Результаты моделирования распространения фотонов через ткани показывают, что количество биолюминесцентных клеток на уровне нескольких сотен может быть обнаружено подкожно, в то время как для обнаружения сигналов на глубине ~2 см в ткани требуется ~10⁶ клеток [68].

Кроме подхода, основанного на люминесценции, в последнее время широко используют

Таблица 1. Модели трансплантируемых опухолей у лабораторных мышей [1, 63–66]

Table 1. Transplantation-based tumour models in laboratory mice [1, 63–66]

Модель <i>Model</i>	Применение <i>Application</i>	Преимущества <i>Advantages</i>	Ограничения <i>Limitations</i>
Ксенографты клеточных линий (CDX) <i>Cell-derived xenografts</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Скрининг молекул-кандидатов (фармакокинетика, эффективность) • Тестирование широкого спектра противоопухолевых препаратов различного механизма действия, в том числе клеточных продуктов • Некоторые модели могут быть использованы для исследования процессов метастазирования • <i>Screening candidate molecules (pharmacokinetics, efficacy)</i> • <i>Testing a wide range of anticancer medicinal products varying in the mechanism of action (including cell-based medicinal products)</i> • <i>Studying the mechanism of metastasis (some models)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Доступная логистика • Стандартизованность • Наличие вариантов с люминесцентными и флуоресцентными метками • <i>Affordable logistics</i> • <i>High level of standardisation</i> • <i>Available options with fluorescent and luminescent labels</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Низкая предиктивность • Ограниченная генетическая однородность • Необходимо использование иммунодефицитных мышей, т.е. нежелательны при исследовании иммуноопосредованных эффектов • <i>Low predictive value</i> • <i>Limited genetic homogeneity</i> • <i>Need for immunodeficient mice (not eligible for studying immune-mediated effects)</i>
Ксенографты опухолей, полученных от пациентов (PDX) <i>Patient-derived xenografts</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Скрининг препаратов • Исследование эффективности • Исследование фармакодинамики • Исследование механизмов устойчивости к препаратам • <i>Screening medicinal product candidates</i> • <i>Studying the efficacy</i> • <i>Studying pharmacodynamics</i> • <i>Studying drug resistance mechanisms</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Гистологическое сходство с исходной опухолью пациента • Подробно охарактеризованы • Показывают высокий уровень предиктивности • <i>Histological similarity between patient tumours and patient-derived xenografts</i> • <i>High level of characterisation</i> • <i>High predictive value</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Необходимо использование иммунодефицитных мышей • Затрудненная логистика и сравнительная дороговизна • Обычно показывают более медленный рост • <i>Need for immunodeficient mice</i> • <i>Cumbersome logistics and relatively high cost</i> • <i>Lower growth rate (usually)</i>
Модели на гуманизированных животных <i>Humanised animal models</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Разработка терапевтических подходов в случае отсутствия «мышинного гомолога» мишени или суррогатных антител • Исследование аспектов иммунного ответа человека на мышинной модели • <i>Developing therapeutic approaches in the absence of murine homologous targets or surrogate antibodies</i> • <i>Studying aspects of human immune responses in murine models</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Возможность оценки выработки человеческих антител • Возможно применение как CDX, так и PDX линий животных • Имитация некоторых аспектов иммунной системы человека • <i>Possibility to assess human antibody production</i> • <i>Possibility to use both CDX and PDX animal models</i> • <i>Possibility to mimic certain aspects of the human immune system</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Дорогостоящие исследования • Невосприимчивость к аллогraftам • Развитие реакции «трансплантат против хозяина» • <i>Expensive studies</i> • <i>Resistance to xenotransplantation</i> • <i>Graft-versus-host reaction</i>
Трансплантация клеток сингенных опухолей <i>Transplantation of syngeneic tumour cells</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Скрининг молекул-кандидатов • Исследование эффективности противоопухолевых препаратов • Исследование механизмов действия противоопухолевых препаратов • <i>Screening candidate molecules</i> • <i>Studying the efficacy of anticancer medicinal products</i> • <i>Studying the mechanisms of action of anticancer medicinal products</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Интактная иммунная система • Сравнительно доступная логистика • Наличие вариантов с люминесцентными и флуоресцентными метками • <i>Intact immune system</i> • <i>Relatively affordable logistics</i> • <i>Available options with fluorescent and luminescent labels</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Низкая предиктивность • За счет массивного бэкграунда возможно генетическое загрязнение, и, следовательно, разница в результатах между разными лабораториями • Общее число моделей ограничено • <i>Low predictive value</i> • <i>Potential genetic contamination due to massive background, and hence interlaboratory result variability</i> • <i>Limited total number of applicable models</i>

Таблица составлена авторами по данным источников [1, 63–66] / The table is adapted by the authors from [1, 63–66]

флуоресцентную детекцию, основанную на трансдукции клеточных линий лентивирусами, кодирующими флуоресцентные белки дальне-красного и ближнего инфракрасного спектра [69, 70]. Данный подход не требует наличия субстрата, а оптическая визуализация в ближней инфракрасной области спектра позволяет повысить чувствительность детекции и избежать автофлуоресценции, возникающей из-за эндогенных флуоресцентных молекул в биологических тканях [71].

Для достижения уровня модификации клеток, близкого к 100% в популяции, как при работе с люциферазами, так и с флуоресцентными белками, используют бицистронные системы генной экспрессии, и часто вторым овер-экспрессируемым геном является ген устойчивости к селективным антибиотикам: пурамицину, зеоцину, генетицину, бластицидину, гигромицину. В связи с этим модифицированные линии проходят этап селекции от 1 до 3 недель. После проведенной селекции наличие данных антибиотиков в культуральной среде не обязательно.

Подходы с применением систем визуализации позволяют производить оценку эффективности противоопухолевых препаратов на моделях как солидных, так и гематологических опухолей, при этом существует возможность отслеживать динамику опухолевого процесса на одном животном.

Другой значимый показатель в исследованиях эффективности лекарственных препаратов с противоопухолевым действием – продолжительность жизни животного с опухолевым процессом. Учитывают гуманные конечные точки: животные должны быть выведены из исследования в случае устойчивой тенденции к потере массы тела, проявления признаков боли и дистресса. Отдельно оценивают физическое состояние животного (body condition score, BCS), так как при развитии опухолевого процесса масса тела животного может выходить на плато, а в некоторых случаях даже расти только за счет увеличения массы опухоли при том, что животное может быть истощено [72]. Кроме того, показателями для выведения животного из эксперимента являются: нарушение целостности опухолевого узла, превышения им размеров 1,5–2 см в диаметре или 2000 мм³ в объеме, нарушение основных физиологических функций на фоне онкологического процесса (невозможность передвигаться, принимать пищу) [73, 74].

Кроме данных о динамике роста опухоли и продолжительности жизни лабораторных животных,

могут быть использованы и другие показатели эффективности терапии в зависимости от типа опухоли и метода лечения. Так, возможна оценка уровня подавления метастатической активности опухоли в условиях противоопухолевого лечения с оценкой количества и размера метастаз. В том случае, если терапия направлена на усиление противоопухолевого иммунитета, необходимы исследования, направленные на выявление рецидивов опухолевого процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успешная трансляция результатов доклинических исследований эффективности противоопухолевых препаратов в клинику в значительной степени зависит от правильности выбора экспериментальной модели (релевантного вида животного, соответствия генетического статуса животного и человека, сходства патогенеза заболеваний и способа терапии).

В работе систематизированы представленные в литературе экспериментальные подходы для моделирования опухолевых процессов у лабораторных животных и способы оценки эффективности противоопухолевых препаратов. Проведен сравнительный анализ используемых в доклинических исследованиях моделей опухолевого процесса у мышей. Определены преимущества и ограничения каждой из них, позволяющие сделать выбор релевантной модели для конкретных задач исследования.

Ввиду высокой востребованности исследований в области онкологии и стремительно растущей информационной и методологической базы количество подходов и инструментов для доклинических исследований противоопухолевых препаратов непрерывно растет. Появляются новые методы флуоресцентного или люминесцентного мечения опухолевых линий для их визуализации *in vivo*, новые возможности тестирования клеточного материала перед *in vivo* этапом. Такое обилие инструментов позволяет максимально комплексно подойти к дизайну исследования и его реализации, что позволяет учесть больше специфических факторов и облегчает преодоление трансляционных барьеров между разными этапами исследований. Использование информации, представленной в настоящей работе, позволит обеспечить достоверность получаемых экспериментальных данных об эффективности противоопухолевых лекарственных средств, а также повысить успех трансляции результатов исследований в клиническую практику.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Day CP, Merlino G, Van Dyke T. Preclinical mouse cancer models: a maze of opportunities and challenges. *Cell*. 2015;163(1):39–53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.068>
2. Sajjad H, Imtiaz S, Noor T, Siddiqui YH, Sajjad A, Zia M. Cancer models in preclinical research: A chronicle review of advancement in effective cancer research. *Animal Model Exp Med*. 2021;4(2):87–103. <https://doi.org/10.1002/ame2.12165>
3. Галагудза ММ, Гушин ЯА, Исакова-Сивак ИН, Карал-Оглы ДД, Ковалева МА, Ловат МЛ и др. Методология доклинических исследований. В кн.: Макаров ВГ, Шестаков ВН, ред. *Консультант GLP-planet. Мнение фармацевтической отрасли*. М.: Русский врач; 2021. С. 56–73. Galagudza MM, Gushchin YaA, Isakova-Sivak IN, Karal-Ogly DD, Kovaleva MA, Lovat ML, et al. Methodology of preclinical studies. In: Makarov VG, Shestakov VN, eds. *GLP-planet consultant. Opinion of the pharmaceutical industry*. Moscow: Russkii Vrach Publishing House; 2021. P. 56–73 (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/978-5-7724-0177-4-s3>
4. Китаева КВ, Ризванов АА, Соловьева ВВ. Современные методы доклинического скрининга противоопухолевых препаратов с применением тест-систем на основе культуры клеток. *Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки*. 2021;163(2):155–76. Kitaeva KV, Rizvanov AA, Solovyeva VV. Modern methods of preclinical anticancer drug screening using test systems based on cell cultures. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*. 2021;163(2):155–76 (In Russ.). <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2021.2.155-176>
5. Lee MW, Miljanic M, Triplett T, Ramirez C, Aung KL, Eckhardt SG, Capasso A. Current methods in translational cancer research. *Cancer Metastasis Rev*. 2021;40(1):7–30. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09931-5>
6. Mahalmani V, Sinha S, Prakash A, Medhi B. Translational research: Bridging the gap between preclinical and clinical research. *Indian J Pharmacol*. 2022;54(6):393–6. https://doi.org/10.4103/2Fijp.ijp_860_22
7. Hay RJ, Reid YA, McClintock PR, Chen TR, Macy ML. Cell line banks and their role in cancer research. *J Cell Biochem Suppl*. 1996;24:107–30. <https://doi.org/10.1002/jcb.240630507>
8. Mirabelli P, Coppola L, Salvatore M. Cancer cell lines are useful model systems for medical research. *Cancers (Basel)*. 2019;11(8):1098. <https://doi.org/10.3390/cancers11081098>
9. Yu C, Mannan AM, Yvone GM, Ross KN, Zhang YL, Marton MA, et al. High-throughput identification of genotype-specific cancer vulnerabilities in mixtures of bar-coded tumor cell lines. *Nat Biotechnol*. 2016;34(4):419–23. <https://doi.org/10.1038/nbt.3460>
10. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 2012;483(7391):603–7. <https://doi.org/10.1038/nature11003>
11. Yang X, Wen Y, Song X, He S, Bo X. Exploring the classification of cancer cell lines from multiple omic views. *PeerJ*. 2020;8:e9440. <https://doi.org/10.7717/peerj.9440>
12. Amereh M, Akbari M. Immunohistochemistry (IHC) staining of *in-vitro* cancer cell-generated tumoroids. *MethodsX*. 2023;10:102242. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102242>
13. Mentink A, Isebia KT, Kraan J, Terstappen L, Stevens M. Measuring antigen expression of cancer cell lines and circulating tumour cells. *Sci Rep*. 2023;13(1):6051. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33179-y>
14. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative stress in cancer. *Cancer Cell*. 2020;38(2):167–97. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>
15. Rockwell S. In vivo-in vitro tumour cell lines: Characteristics and limitations as models for human cancer. *Br J Cancer Suppl*. 1980;4:118–22. PMID: 6932914
16. Pinho JO, Matias M, Godinho-Santos A, Amaral JD, Mendes E, Perry MJ, et al. A step forward on the *in vitro* and *in vivo* assessment of a novel nanomedicine against melanoma. *Int J Pharm*. 2023;640:123011. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123011>
17. Almutairi MS, Hassan ES, Keeton AB, Piazza GA, Abdelhameed AS, Attia MI. Antiproliferative activity and possible mechanism of action of certain 5-methoxyindole tethered C-5 functionalized isatins. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13:3069–78. <https://doi.org/10.2147/dddt.s208241>
18. Ediriweera MK, Tennekoon KH, Samarakoon SR. In-vitro anti-proliferative assays and techniques used in pre-clinical anti-cancer drug discovery. *Frontiers in Anti-Cancer Drug Discovery*. 2019;10:43–61. <https://doi.org/10.2174/97898114400711119100005>
19. Mishra R, Mishra PS, Varshney S, Mazumder R, Mazumder A. *In vitro* and *in vivo* approaches for screening the potential of anticancer agents: A review. *Curr Drug Discov Technol*. 2022;19(3):e060122200071. <https://doi.org/10.2174/1570163819666220106122811>
20. Афанасьева АН, Сапарова ВВ, Сельменских ТА, Макаренко ИЕ. Выбор оптимального метода детекции жизнеспособности клеточных культур для тестов на пролиферативную активность и цитотоксичность. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2021;(2):16–24. Afanaseva AN, Saparova VB, Selenskikh TA, Makarenko IE. Optimal choice method of detection of the viability of cell cultures for tests on proliferation and cytotoxicity. *Laboratory Animals for Science*. 2021;(2):16–24 (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-02-03>
21. Dadmehr M, Mortezaei M, Korouzhdehi B. Dual mode fluorometric and colorimetric detection of matrix metalloproteinase MMP-9 as a cancer biomarker based on AuNPs@gelatin/AuNCs nanocomposite. *Biosens Bioelectron*. 2023;220:114889. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114889>
22. Batool S, Javaid S, Javed H, Asim L, Shahid I, Khan M, Muhammad A. Addressing artifacts of colorimetric anticancer assays for plant-based drug development. *Med Oncol*. 2022;39(12):198. <https://doi.org/10.1007/s12032-022-01791-z>
23. Cobaleda C, Sánchez-García I. Leukemia stem cell drug discovery. *Methods Mol Biol*. 2021;2185:39–48. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0810-4_3
24. Nakamura D. The evaluation of tumorigenicity and characterization of colonies in a soft agar colony formation assay using polymerase chain reaction. *Sci Rep*. 2023;13:5405. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32442-6>
25. Bobadilla AVP, Arévalo J, Sarró E, Byrne HM, Maini PK, Carraro T, et al. *In vitro* cell migration quantification method for scratch assays. *J R Soc Interface*. 2019;16(151):20180709. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0709>
26. Cheon D-J, Orsulic S. Mouse models of cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:95–119. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.3.121806.154244>
27. Rivina L, Schiestl R. Mouse models of radiation-induced cancers. *Adv Genet*. 2013;84:83–122. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407703-4.00003-7>
28. Li Z, Zheng W, Wang H, Cheng Y, Fang Y, Wu F, et al. Application of animal models in cancer research: Recent progress and future prospects. *Cancer Manag Res*. 2021;13:2455–75. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S302565>
29. Yusuf K, Umar S, Ahmed I. Animal models in cancer research. In: Pathak S, Banerjee A, Bisgin A, eds. *Handbook of animal models and its uses in cancer research*. Singapore: Springer; 2023. https://doi.org/10.1007/978-981-19-3824-5_17

30. Chen X, Li Y, Yao T, Jia R. Benefits of zebrafish xenograft models in cancer research. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:616551. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.616551>
31. Gamble JT, Elson DJ, Greenwood JA, Tanguay RL, Kolluri SK. The zebrafish xenograft models for investigating cancer and cancer therapeutics. *Biology (Basel).* 2021;10(4):252. <https://doi.org/10.3390/biology10040252>
32. Schachtschneider KM, Schwind RM, Newson J, Kinach-tchouk N, Rizko M, Mendoza-Elias N, et al. The onco-pig cancer model: An innovative large animal trans-lational oncology platform. *Front Oncol.* 2017;7:190. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00190>
33. Bailey KL, Carlson MA. Porcine models of pancreatic cancer. *Front Oncol.* 2019;9:144. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00144>
34. Kalla D, Kind A, Schnieke A. Genetically engineered pigs to study cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):488. <https://doi.org/10.3390/ijms21020488>
35. Robertson N, Schook LB, Schachtschneider KM. Porcine cancer models: Potential tools to enhance cancer drug trials. *Expert Opin Drug Discov.* 2020;15(8):893–902. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1757644>
36. Simmons HA, Mattison JA. The incidence of spontaneous neoplasia in two populations of captive rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(2):221–7. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3311>
37. Chapman KL, Pullen N, Andrews L, Ragan I. The future of non-human primate use in mAb development. *Drug Discov Today.* 2010;15(5–6):235–42. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.01.002>
38. Deycmar S, Gomes B, Charo J, Ceppi M, Cline JM. Spontaneous, naturally occurring cancers in non-human primates as a translational model for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2023;11(1):e005514. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-005514>
39. Dewi FN, Cline JM. Nonhuman primate model in mammary gland biology and neoplasia research. *Lab Anim Res.* 2021;37(1):3. <https://doi.org/10.1186/s42826-020-00053-1>
40. Pisano M, Cheng Y, Sun F, Dhakal B, D'Souza A, Chhabra S, et al. Laboratory mice – a driving force in immunopathology and immunotherapy studies of human multiple myeloma. *Front Immunol.* 2021;12:667054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.667054>
41. Sargent JK, Warner MA, Low BE, Schott WH, Hoffert T, Coleman D, et al. Genetically diverse mouse platform to xenograft cancer cells. *Dis Model Mech.* 2022;15(9):dmm049457. <https://doi.org/10.1242/dmm.049457>
42. Onaciu A, Munteanu R, Munteanu VC, Gulei D, Raduly L, Feder RI, et al. Spontaneous and induced animal models for cancer research. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(9):660. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10090660>
43. Hoffmann J. Integrative oncology drug discovery accompanied by preclinical translational research as prerequisite for clinical development. *Chin Clin Oncol.* 2014;3(2):15. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3865.2014.05.09>
44. Durinikova E, Buzo K, Arena S. Preclinical models as patients' avatars for precision medicine in colorectal cancer: Past and future challenges. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021;40(1):185. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01981-z>
45. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
46. Guerin MV, Finisguerra V, Van den Eynde BJ, Bercovici N, Trautmann A. Preclinical murine tumor models: A structural and functional perspective. *Elife.* 2020;9:e50740. <https://doi.org/10.7554/elife.50740>
47. Kemp CJ. Animal models of chemical carcinogenesis: Driving breakthroughs in cancer research for 100 years. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015;(10):865–74. <https://doi.org/10.1101/pdb.top069906>
48. Oka K, Fujioka S, Kawamura Y, Komohara Y, Chujo T, Sekiguchi K, et al. Resistance to chemical carcinogenesis induction via a dampened inflammatory response in naked mole-rats. *Commun Biol.* 2022;5(1):287. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03241-y>
49. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Chemical agents and related occupations.* Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012.
50. Naito T, Higuchi T, Shimada Y, Kakinuma C. An improved mouse orthotopic bladder cancer model exhibiting progression and treatment response characteristics of human recurrent bladder cancer. *Oncol Lett.* 2020;19(1):833–9. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.11172>
51. Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis *in vivo*. *Carcinogenesis.* 2005;26(3):513–23. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh261>
52. Liu Y, Wu W, Cai C, Zhang H, Shen H, Han Y. Patient-derived xenograft models in cancer therapy: Technologies and applications. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):160. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01419-2>
53. Richmond A, Su Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis Model Mech.* 2008;1(2–3):78–82. <https://doi.org/10.1242/dmm.000976>
54. Tian H, Lyu Y, Yang Y-G, Hu Z. Humanized rodent models for cancer research. *Front Oncol.* 2020;10:1696. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01696>
55. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature.* 2017;541(7637):321–30. <https://doi.org/10.1038/nature21349>
56. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: From T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(11):651–68. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>
57. Esfahani K, Roudaia L, Buhlaiga N, Del Rincon SV, Papneja N, Miller WH Jr. A review of cancer immunotherapy: From the past, to the present, to the future. *Curr Oncol.* 2020;27(Suppl 2):S87–S97. <https://doi.org/10.3747/co.27.5223>
58. Cogels MM, Rouas R, Ghanem GE, Martinive P, Awada A, Van Gestel D, Krayem M. Humanized mice as a valuable pre-clinical model for cancer immunotherapy research. *Front Oncol.* 2021;11:784947. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.784947>
59. Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: Progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(11):786–98. <https://doi.org/10.1038/nri3311>
60. Tan JHL, Hwang YY, Chin HX, Liu M, Tan SY, Chen Q. Towards a better preclinical cancer model – human immune aging in humanized mice. *Immun Ageing.* 2023;20(1):49. <https://doi.org/10.1186/s12979-023-00374-4>
61. Hu Z, Yang YG. Human lymphohematopoietic reconstitution and immune function in immunodeficient mice receiving cotransplantation of human thymic tissue and CD34(+) cells. *Cell Mol Immunol.* 2012;9(3):232–6. <https://doi.org/10.1038/cmi.2011.63>
62. McIntosh BE, Brown ME, Duffin BM, Maufort JP, Vereide DT, Slukvin II, Thomson JA. Nonirradiated NOD.B6.SCID Il2ry^{-/-} Kit^{W41/W41} (NBSGW) mice support multilineage engraftment of human hematopoietic cells. *Stem Cell Reports.* 2015;4(2):171–80. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.12.005>
63. Jin J, Yoshimura K, Sewastjanow-Silva M, Song S, Ajani JA. Challenges and prospects of patient-derived xenografts for cancer research. *Cancers (Basel).* 2023;15(17):4352. <https://doi.org/10.3390/cancers15174352>
64. He M, Henderson M, Muth S, Murphy A, Zheng. Preclinical mouse models for immunotherapeutic and non-immunotherapeutic drug development for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Pancreat Cancer.* 2020;3:7. <https://doi.org/10.21037/apc.2020.03.03>

65. Long Y, Xie B, Shen HC, Wen D. Translation potential and challenges of *in vitro* and murine models in cancer clinic. *Cells*. 2022;11(23):3868. <https://doi.org/10.3390/cells11233868>
66. Li Q-X, Feuer G, Ouyang X, An X. Experimental animal modeling for immuno-oncology. *Pharmacol Ther*. 2017;173:34–46. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.002>
67. Brennan TV, Lin L, Huang X, Yang Y. Generation of luciferase-expressing tumor cell lines. *Bio Protoc*. 2018;8(8):e2817. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2817>
68. Rice BW, Cable MD, Nelson MB. *In vivo* imaging of light-emitting probes. *J Biomed Opt*. 2001;6(4):432–40. <https://doi.org/10.1117/1.1413210>
69. Левчук КА, Богданова ДА, Ершова АЕ, Смирнов СВ, Голдаева АА, Васютина МЛ и др. Прямое сравнение вариантов дальне-красных флуоресцентных белков KATUSHKA с люциферазной биолюминесценцией на ксенографтных мышиных моделях изучения опухолей эпителиального происхождения. *Трансляционная медицина*. 2022;9(6):59–70. Levchuk KA, Bogdanova DA, Ershova AE, Smirnov SV, Goldaeva AA, Vasuytina ML, et al. Direct comparison of KATUSHKA far-red fluorescent protein variants with luciferase bioluminescence in xenograft mouse models of epithelial tumor studies. *Translational Medicine*. 2022;9(6):59–70 (In Russ.). <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2022-9-6-59-70>
70. Choi YJ, Ramos SC, Sim HB, Han JY, Park DH, Mun SK, Lee JB, Lee CH, Lee YA, Kim JJ. Promising approach for optimizing *in vivo* fluorescence imaging in a tumor mouse model: Precision in cancer research. *Anticancer Research*. 2024;44(10):4347–58. <https://doi.org/10.21873/anticancer.17264>
71. Diao S, Hong G, Antaris AL, Blackburn JL, Cheng K, Cheng Z, et al. Biological imaging without autofluorescence in the second near-infrared region. *Nano Res*. 2015;8:3027–34. <https://doi.org/10.1007/s12274-015-0808-9>
72. Paster EV, Villines KA, Hickman DL. Endpoints for mouse abdominal tumor models: refinement of current criteria. *Comp Med*. 2009;59(3):234–41. PMID: PMC2735284
73. Silva-Reis R, Faustino-Rocha AI, Gonçalves M, Ribeiro CC, Ferreira T, Ribeiro-Silva C, et al. Refinement of animal model of colorectal carcinogenesis through the definition of novel humane endpoints. *Animals (Basel)*. 2021;11(4):985. <https://doi.org/10.3390/ani11040985>
74. Winn CB, Hwang SK, Morin J, Bluetette CT, Manickam B, Jiang ZK, et al. Automated monitoring of respiratory rate as a novel humane endpoint: A refinement in mouse metastatic lung cancer models. *PLoS One*. 2021;16(9):e0257694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257694>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: М.Л. Васютина, Я.Г. Торопова, К.В. Лепик, А.В. Петухов — концепция работы, написание текста рукописи, формулирование выводов; М.С. Истомина, К.А. Левчук, Е.В. Щелина, А.Е. Ершова — сбор и анализ источников литературы; О.Н. Демидов — участие в формулировании выводов, критический пересмотр текста и 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. Marina L. Vasyutina, Yana G. Toropova, Kirill V. Lepik, and Alexey V. Petukhov conceptualised the study, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. Maria S. Istomina, Ksenia A. Levchuk, Ekaterina V. Shchelina, and Alina E. Ershova collected and analysed literature. Oleg N. Demidov participated in the formulation of the conclusions, critically revised the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Васютина Марина Львовна / Marina L. Vasyutina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3295-8411>

Лепик Кирилл Викторович, канд. мед. наук / Kirill V. Lepik, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4056-050X>

Истомина Мария Сергеевна / Maria S. Istomina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2497-653X>

Левчук Ксения Александровна / Ksenia A. Levchuk

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2883-2496>

Петухов Алексей Вячеславович / Alexey V. Petukhov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7298-5238>

Щелина Екатерина Викторовна / Ekaterina V. Shchelina

Ершова Алина Евгеньевна / Alina E. Ershova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5791-8360>

Демидов Олег Николаевич, д-р мед. наук / Oleg N. Demidov, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4323-7174>

Торопова Яна Геннадьевна, д-р биол. наук / Yana G. Toropova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1629-7868>

Поступила 06.05.2024

После доработки 10.09.2024

Принята к публикации 04.12.2024

Online first 31.01.2025

Received 6 May 2024

Revised 10 September 2024

Accepted 4 December 2024

Online first 31 January 2025



И.И. Яичков¹ 
А.Л. Хохлов² 
М.К. Корсаков¹ 
Н.Н. Вольхин^{1,2} 
С.С. Петухов¹ 
О.Э. Лазарянц¹ 
А.В. Коровина¹ 

Изучение распределения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]- фуран-2-сульфонамида и его метаболитов на крысах

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

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

✉ Яичков Илья Игоревич; iyaichkov@yspu.org

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Статья является продолжением цикла работ по исследованию фармакокинетики нового соединения для лечения открытоугольной глаукомы 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (TFISA). Распределение данного вещества и его метаболитов по органам и тканям ранее в доклинических исследованиях не изучалось.

ЦЕЛЬ. Валидация методик определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в биологических образцах. Оценка распределения и тканевой доступности 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в органах и тканях крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Исследование выполнено на 60 крысах-самцах линии Wistar. Введение TFISA проводили путем закапывания в каждый глаз 40 мкл 1% глазной суспензии (около 3,7 мг/кг). Отбор проб печени, почек, легких, мозга, сердца, селезенки, кожи, мышц, глаз осуществляли через 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 144, 216 ч после инстилляции. На каждую точку использовано по 6 особей. Образцы немедленно гомогенизировали с применением метанола и стабилизировали добавлением аскорбиновой кислоты. Количественное определение TFISA, N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M1) и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M2) в образцах выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Полная валидация методик определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов была выполнена отдельно для тканей глаз и отдельно для других биологических объектов. Тканевая биодоступность (f_t) TFISA уменьшалась в следующей последовательности в диапазоне 13,0–0,7: ткани глаза (место введения и действия) > селезенка > легкие ≥ сердце > печень > почки > мозг > кожа ≥ мышцы. Величина f_t M1 снижалась с 52,0 до 2,5 в ряду селезенка ≥ легкие ≥ сердце ≥ печень > почки > мозг > мышцы ≥ ткани глаза > кожа. Значения f_t M2 были ниже, чем TFISA и M1, и уменьшались с 6,4 до 0,3 в ряду печень ≥ почки > сердце > легкие > ткани глаза > кожа > селезенка ≥ мышцы > мозг.

ВЫВОДЫ. Валидированные биоаналитические методики успешно применены для изучения распределения TFISA и его метаболитов на самцах крыс. Действующее вещество лучше всего проникает в глаза и органы животных с хорошей васкуляризацией. Высокая тканевая биодоступность M1 наблюдается в селезенке, сердце, легких; высокая тканевая биодоступность M2 — в печени и почках крыс.

Ключевые слова: ингибитор карбоангидразы II, N-гидроксисульфонамид; глазные капли; крысы; ВЭЖХ-МС/МС; валидация; распределение; фармакокинетика; глаукома; доклинические исследования

Для цитирования: Яичков И.И., Хохлов А.Л., Корсаков М.К., Вольхин Н.Н., Петухов С.С., Лазарянц О.Э., Корovina А.В. Изучение распределения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов на крысах. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(3):301–312. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ilya I. Yaichkov¹ 
Alexander L. Khokhlov² 
Mikhail K. Korsakov¹ 
Nikita N. Volkhin^{1,2} 
Sergey S. Petukhov¹ 
Olga E. Lazariants¹ 
Alena V. Korovina¹ 

Distribution Study of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and Its Metabolites in Rats

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

² Yaroslavl State Medical University, 5 Revolutsionnaya St., Yaroslavl 150000, Russian Federation

✉ Ilya I. Yaichkov; i.yaichkov@yspu.org

ABSTRACT

INTRODUCTION. This article continues a series of publications on the pharmacokinetics of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (TFISA), a novel compound for the treatment of open-angle glaucoma. The distribution of TFISA and its metabolites in rat organs and tissues has not been previously studied in preclinical trials.

AIM. This study aimed to assess the tissue distribution and bioavailability of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazol-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in rat organs and tissues and to validate the analytical procedures developed for this purpose.

MATERIALS AND METHODS. The study used 60 male Wistar rats. TFISA was administered by bilateral ocular instillation of 1% ophthalmic suspension at a dose of 40 μ L (approximately 3.7 mg/kg). Tissue samples (liver, kidney, lung, brain, heart, spleen, skin, muscle tissue, and eyes) were collected 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 144, and 216 h after instillation (from 6 rats at each time point). The samples were immediately homogenised using methanol and were stabilised with ascorbic acid solutions. High-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection was used to quantify TFISA, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (M1), and N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (M2) in homogenised organ and tissue samples.

RESULTS. This study involved full validation of the analytical procedures developed for the quantitative determination of TFISA and its metabolites, which was conducted separately for eye tissues and other biological samples. The tissue bioavailability (f_t) of TFISA decreased from 13.0 to 0.7 in the following order: eye tissues (administration and action site) > spleen > lungs \geq heart \geq liver > kidneys > brain > skin \geq muscles. The f_t values for M1 decreased from 52.0 to 2.5 in the following order: spleen \geq lungs \geq heart \geq liver > kidneys > brain > muscles \geq eye tissues > skin. The f_t values for M2 were lower than those for TFISA and M1 and decreased from 6.4 to 0.3 in the following order: liver \geq kidneys > heart > lungs > eye tissues > skin > spleen \geq muscles > brain.

CONCLUSION. The validated bioassays have been successfully applied to study the distribution of TFISA and its metabolites in male rats. TFISA best penetrates into the eyes and well-vascularised organs. M1 is highly bioavailable in the spleen, heart, and lungs. M2 shows the highest bioavailability in the liver and kidneys of rats.

Keywords: carbonic anhydrase II inhibitor, N-hydroxy sulfonamide; eye drops; rats; HPLC–MS/MS; validation; distribution; pharmacokinetics; glaucoma; preclinical studies

For citation: Yaichkov I.I., Khokhlov A.L., Korsakov M.K., Volkhin N.N., Petukhov S.S., Lazariants O.E., Korovina A.V. Distribution study of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in rats. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(3):301–312. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

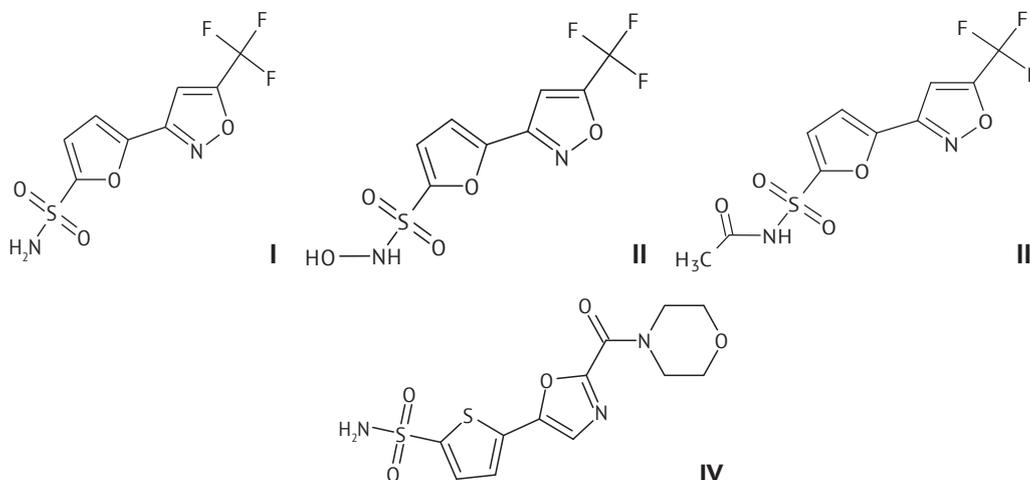
ВВЕДЕНИЕ

Изучение распределения активных веществ и их метаболитов в организме лабораторных животных является обязательным при создании новых лекарственных препаратов. В ходе данного исследования оценивают динамику накопления действующего вещества и его метаболитов в органах и тканях, скорость их выведения, выявляют возможные области их депонирования, что позволяет создать многокамерную фармакокинетическую модель¹.

Синтезированный нами ингибитор карбоангидразы II типа 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (TFISA) (I) способен эффективно снижать внутриглазное давление после местного применения [1], при этом он всасывается в системный кровоток [2]. Так, величина относительной биодоступности TFISA после закапывания в глаза крысам 1% суспензии TFISA по сравнению с внутривнутриглазной инъекцией составляет около 90%. После попадания в организм сульфонамидная группа действующего вещества подвергается гидроксилированию с образованием N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (II) (M1) и ацилированию с образованием N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (III) (M2). Данные вещества, как и другие ингибиторы карбоангидразы, способны накапливаться в эритроцитах, что обуславливает их длительное выведение из организма. Так,

TFISA и его метаболиты присутствовали в пробах мочи и фекалий на протяжении 336 ч после инстилляции его глазной суспензии крысам. Основным путем экскреции изучаемых соединений является ренальный [2]. Исследование распределения TFISA и его метаболитов ранее не проводили.

N-гидроксиметаболит TFISA способен разлагаться в биологических пробах с образованием 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфоновой кислоты [2], поэтому для достоверного определения концентрации M1 в органах крысы необходим подбор специальных условий его стабилизации в пробах. Сразу после аутопсии животного требуется немедленная гомогенизация образцов, наиболее подходящим способом которой является механическое измельчение тканей с помощью лабораторных шаровых мельниц [3, 4]. Данный способ быстрее и универсальнее, чем ультразвуковая [5, 6] и ферментативная гомогенизация [7]. Его применение позволяет максимально сократить время перевода M1 в жидкую фазу для последующего добавления растворов антиоксиданта. В качестве экстрагентов при этом возможно применение воды [8], физиологических растворов [5, 9], 0,1 М раствора хлорной кислоты [6], фосфатного буферного раствора [3] и других растворителей и их смесей [9–11]. При проведении протеомных и метаболомных исследований возможна



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

обработка образцов тканей и органов специфическими ингибиторами ферментов [12].

Известны случаи использования антиоксидантов для предотвращения разложения катехоламинов в пробах мозга крыс. Так, к метанольным гомогенатам добавляли 5% раствор аскорбиновой кислоты [13], данное соединение также применяли для количественного определения М1 в плазме и моче крыс [2], поэтому возможность его использования для стабилизации N-гидроксипроизводного TFISA необходимо оценить в первую очередь.

Цель работы – оценка распределения и тканевой биодоступности 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в органах и тканях крыс. В задачи исследования также входили подбор метода стабилизации проб, содержащих N-гидроксисульфонамиды, и валидация методик исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Субстанция 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его 1% глазная суспензия (лабораторная серия) были произведены в Центре трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ЯГПУ им. К.Д. Ушинского (г. Ярославль). Стандартные образцы TFISA, его метаболитов, внутреннего стандарта 5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамида (THSA) (IV) также были синтезированы и аттестованы в данной лаборатории. Подтверждение структуры и чистоты данных веществ осуществляли методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса, масс-спектрометрии высокого и низкого разрешения, инфракрасной спектроскопии, высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии.

Для исследования использован tandemный масс-спектрометрический детектор AB Sciex QTRAP 5500 (AB Sciex) в комбинации с жидкостным хроматографом Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies). Для управления ВЭЖХ-МС/МС-системой использовано программное обеспечение «Analyst 1.6.2», для интегрирования хроматограмм и количественных расчетов – «MultiQuant 3.0.5» (AB Sciex).

Методы. Хроматографическое разделение проводили в тех же условиях, что и при исследованиях плазмы и крови в работах [2], с применением хроматографической колонки Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (150×3,0 мм, 3,5 мкм) с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (12,5×2,1 мм, 5,0 мкм)

(Agilent Technologies). Подвижная фаза – 0,1% водный раствор муравьиной кислоты (Optima LC-MS-Grade, Thermo Fisher Scientific) (компонент А) и метанол (LiChrosolv hypergrade for LC-MS, Merck KGaA) (компонент Б). Масс-спектрометрическое детектирование в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) проводили при тех же условиях и по той же методике, что и в работе [2].

Основные растворы с концентрацией 1000 мкг/мл готовили путем растворения субстанций TFISA (99,1%), его метаболитов М1 (98,2%) и М2 (98,5%) и внутреннего стандарта THSA (98,3%) в диметилсульфоксиде (х.ч., АО «Ленреактив») (режим хранения – не выше +4 °С). Комбинированные рабочие растворы аналитов получали с применением метанола (ос.ч., ООО «ТД «Химмед»). Концентрации изучаемых соединений в калибровочных образцах (К1–К8), образцах контроля качества (нижнего предела количественного определения (НПКО), нижнего (LQC), среднего (MQC) и верхнего (HQC) уровня концентраций), образцах для проведения теста разведения (Dil) представлены в таблице 1.

Пробы каждого органа взвешивали с точностью до 0,1 мг. Затем к навескам образцов добавляли метанол: к навескам тканей глаз в соотношении 1:3 (мг : мкл), к навескам других объектов – в соотношении 1:1 (мг : мкл). Гомогенизацию проводили с помощью шарикового гомогенизатора Homogenizer Bioprep-6 (Allsheng) двумя стальными шариками диаметром 5 мм (2 цикла перемешивания по 1 мин, интервал 5 с). Смесь центрифугировали 5 мин при 3000 об./мин (Heraeus Multifuge X3R, Thermo Fisher Scientific), затем к 95 мкл надосадочной жидкости добавляли растворы аскорбиновой кислоты в различных концентрациях и 5 мкл рабочего раствора аналитов. Для предотвращения разложения N-гидроксисульфонамида к супернатантам гомогенатов тканей глаза добавляли 5% раствор аскорбиновой кислоты в соотношении 1:5 (об. : об.), к супернатантам гомогенатов других изучаемых органов и тканей – 10% раствор аскорбиновой кислоты в соотношении 1:1 (об. : об.). Полученные образцы хранили при температуре не выше –70 °С (морозильная камера MELING DV-HL218).

Лабораторные животные. Исследование распределения TFISA и его метаболитов проводили на 60 крысах-самцах линии Wistar (питомник ООО «СМК Стезар», г. Владимир). Масса животных составила 227±1 г, возраст – 15 недель. Доступ к комбикорму (АО «Гатчинский ККЗ»)

Таблица 1. Концентрация изучаемых соединений в образцах органов и тканей крыс с добавкой стандарта

Table 1. Concentrations of the studied compounds in spiked organ and tissue samples

Образец Sample	Концентрация, нг/г Concentration, ng/g					
	TFISA		M1		M2	
	Органы и ткани Organs and tissues	Глаза Eyes	Органы и ткани Organs and tissues	Глаза Eyes	Органы и ткани Organs and tissues	Глаза Eyes
K1 (НПКО / LLOQ)	20	80	2	8	0,1	0,4
K2	100	400	10	40	0,5	2,0
K3	500	2000	50	200	2,5	12,5
K4	2000	8000	200	800	10,0	40,0
K5	5000	20000	500	2000	25,0	100,0
K6	10000	40000	1000	4000	50,0	200,0
K7	15000	60000	1500	6000	75,0	300,0
K8	20000	80000	2000	8000	100,0	400,0
LQC	60	240	6	24	0,3	1,2
MQC	7500	30000	750	3000	37,5	187,5
HQC	17500	70000	1750	7000	87,5	350,0
Dil	35000	140000	3500	14000	175,0	700,0

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

Примечание. TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; K1–K8 – калибровочные образцы; НПКО – нижний предел количественного определения; LQC, MQC, HQC – образцы контроля качества нижнего, среднего и верхнего уровня концентраций; Dil – концентрация для оценки эффекта разведения.

Note. TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; K1–K8, calibration samples; LLOQ, lower limit of quantification; LQC, low concentration quality control sample; MQC, middle concentration quality control sample; HQC, high concentration quality control sample; Dil, concentration for the dilution integrity test.

и воде ограничивали за 4 ч до введения изучаемого препарата и 2 ч после введения. Режим освещения во время эксперимента: 12 ч – день, 12 ч – ночь.

Образцы сравнения органов и тканей получали от интактных крыс линии Wistar массой более 350 г после их декапитации.

Валидация биоаналитических методик выполнена с соблюдением требований ЕАЭС и руководства Международного совета по гармонизации (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)². Испытания тканей глаза крыс проводили в полном объеме³, так как для данного объекта при гомогенизации применяли другие, нежели в экспериментах с другими тканями, соотношения метанола и биологического образца, концентрации раствора стабилизатора, объем-

ное соотношение гомогената и раствора стабилизатора, также исследования проводились в других диапазонах концентрации аналитов.

Селективность, эффект матрицы, линейность, долгосрочную стабильность оценивали отдельно для каждого органа и ткани. После успешных испытаний дизайн валидации был оптимизирован и количество серий по определению правильности и прецизионности сокращено до 2 для каждого объекта. Исследования эффекта разведения, эффекта переноса из предыдущей пробы, воспроизводимости при повторном введении, краткосрочной стабильности, стабильности после 3 циклов разморозки/заморозки, стабильности проб в автодозаторе выполняли на образцах печени.

Фармакокинетическое исследование. Глазную суспензию 1% TFISA закапывали в каждый глаз

² Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. ICH; 2022.

³ Были проведены все необходимые эксперименты для валидации хроматографических методик испытания.

в объеме около 40 мкл, что соответствовало дозировке 3,7 мг/кг, использовавшейся в ранее проведенных исследованиях [2]. Отбор образцов печени, почек, легких, мозга, сердца, селезенки, кожи, мышц, глаз осуществляли спустя 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 144, 216 ч после инстилляции препарата. На каждую временную точку использовали по 6 особей. Крыс эвтаназировали декапитацией с применением лабораторной гильотины (ООО «НПК Открытая Наука») сразу после обязательной анестезии ингаляцией диэтиловым эфиром (х.ч., ООО «Кузбассоргхим»)⁴. Данное средство, как и изофлуран, не влияет на активность печеночных ферментов, что не искажает результаты исследований фармакокинетики [14].

Животных немедленно подвергали аутопсии: вскрывали брюшную полость, извлекали сердце, затем легкие, селезенку, печень и почки. Далее получали образцы глаз и головного мозга после вскрытия черепной коробки⁵ [15]. Последними отбирали образцы кожи и мышц бедра [16]. Разделение глаза на отдельные ткани не проводили, что связано с небольшим размером цилиарного тела, в которое должно проникнуть действующее вещество для подавления активности карбоангидразы II [17, 18], что не позволяет получить достаточный для анализа объем биоматериала. Для подобных исследований, как правило, используют более крупных животных – кроликов [19–21].

Исследуемые органы и ткани промывали деионизированной водой для удаления остатков крови с поверхности, обрабатывали жидким азотом, взвешивали с точностью до 0,1 мг, затем гомогенизировали и стабилизировали по описанной выше методике. Затем образцы замораживали и хранили при температуре не выше $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (морозильная камера MELING DV-HL218). Исследование одобрено этическим комитетом ЯГПУ им. К.Д. Ушинского (протокол № 2 от 10.10.2023).

Фармакокинетические параметры оценивали с применением программного пакета R v. 3.3.2 (модуль Bear v. 2.7.7) (R-Project)⁶. Фармакокинетические кривые строили по средним значениям концентраций изучаемых соединений в каждой временной точке, по ним рассчитывали: максимальную концентрацию анализа в органе или ткани (C_{\max}); время достижения

максимальной концентрации анализа в органе или ткани (T_{\max}); площадь под фармакокинетической кривой с точки приема препарата до точки отбора (AUC_{0-t}); площадь под фармакокинетической кривой с точки приема препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$); период полувыведения анализа из органа или ткани ($T_{1/2T}$); среднее время удержания анализа в органе или ткани (MRT_T).

Тканевую биодоступность (f_t) изучаемых соединений по отношению к плазме крови рассчитывали по формуле (1).

$$f_t = \frac{AUC_{0-\infty}(\text{орган})}{AUC_{0-\infty}(\text{плазма})}, \quad (1)$$

где $AUC_{0-\infty}(\text{орган})$ – площадь под фармакокинетической кривой с точки приема препарата до бесконечности в изучаемом органе или ткани, $AUC_{0-\infty}(\text{плазма})$ – площадь под фармакокинетической кривой с точки приема препарата до бесконечности в плазме (по данным [2]).

Статистические методы. Описательная статистика (среднее арифметическое (M), стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD), стандартная ошибка среднего (SEM)) выполнена с помощью программного обеспечения «Statsoft Statistica 10.0.1011».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование стабильности проб. Перед валидацией методики определения содержания TFISA и его метаболитов проведены предварительные испытания краткосрочной стабильности (STS), стабильности при замораживании/оттаивании (FTS) TFISA в гомогенатах органов и его стабильности в пробах, находящихся в автодозаторе (ASS). Для приготовления гомогенатов выбран метанол, как и в случае определения анализов в фекалиях [2]. Концентрация анализов в пробах находилась на уровне НОС. Было изучено влияние добавок 5 и 10% растворов аскорбиновой кислоты (AA) на стабильность М1. На начальной стадии анализировали по 2 пробы каждого биологического объекта с применением растворов AA обеих концентраций. В экспериментах были последовательно использованы объемные соотношения 1:5, 1:2 и 1:1 (раствор AA : гомогенат). Условия стабилизации образца считались подобранными, если количество М1, определяемое в пробах после процедуры стабилизации,

⁴ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.11.2023 № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований».

⁵ Беляева ЕВ, Гушин ЯА, Устенко ЖЮ. Рекомендации по проведению некропсии лабораторных животных. СПб.: Дом фармации; 2023.

⁶ <https://cran.r-project.org/>

составляло 85–115% от начального значения М1. Для подтверждения найденных условий проводили дополнительно по 4 эксперимента на образцах каждого органа и ткани.

В случае менее концентрированных гомогенатов глаз приемлемая стабильность была достигнута добавлением 5% раствора АА в объемном соотношении раствор АА : гомогенат 1:5. Разложение М1 в образцах печени, почек, селезенки, сердца, головного мозга, легких, кожи и мышц удалось предотвратить путем добавления 10% раствора АА в соотношении раствор АА : гомогенат 1:1. Также была подтверждена стабильность М1 в случае гомогенизации в отсутствие стабилизаторов (SPS): к навеске неизмельченной ткани добавляли рабочий раствор аналитов с концентрацией НҚС (табл. 1) из расчета 0,1 мкл на 1 мг ткани (0,2 мкл на 1 мг в случае глаз), а затем метанол в пропорциях 1:3 (мг образца тканей глаз : мкл метанола) и 1:1 для остальных органов (мг образца : мкл метанола) (за вычитанием объема добавленного рабочего раствора) (рис. 1 «Стабильность N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида в пробах биологического материала», опубликован на сайте журнала⁷). В ходе экспериментов проводили 6 циклов измельчения по 1 мин с интервалом 5 с вместо 2 циклов, рекомендованных при проведении описанной выше пробоподготовки. Содержание М1, TFISA и М2 сразу после гомогенизации в испытании SPS укладывалось в требуемый диапазон 85–115% от начальной концентрации.

Эффект матрицы также оценивали на гомогенатах каждого исследуемого органа и ткани. Было проанализировано по 6 образцов на нижнем и верхнем уровнях концентрации. RSD нормализованного матричного коэффициента (NMF) TFISA, М1 и М2 каждого исследуемого объекта не превышал 15% (табл. 2 «Оценка статистических характеристик методики количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его метаболитов в гомогенатах образцов биологических тканей крыс», опубликована на сайте журнала⁸). Абсолютные значения NMF аналитов во всех матрицах были близки. Их расхождение составляло менее 15%.

Оценку селективности проводили на образцах каждого исследуемого объекта. На хроматограммах холостых проб пики идентифицировались только на MRM-переходах TFISA. Величина их площади составляла 1,5–12,5% от площади пика TFISA на соответствующей хроматограмме образца, содержащего аналиты на уровне НПКО. Хроматографических пиков в области времени удерживания метаболитов М1 и М2, а также THSA не обнаружено (рис. 2 «Примеры хроматограмм холостого образца печени крысы и печени образца, содержащего 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламид и его метаболиты на уровне концентраций уровне нижнего предела количественного определения», опубликован на сайте журнала⁹). Относительная погрешность количественного определения анализируемых веществ на уровне НПКО в каждом изучаемом органе и ткани составляла $\pm 20\%$ от теоретического значения, коэффициент вариации рассчитанной концентрации не превышал 20% (табл. 3 «Оценка правильности и прецизионности метода количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его метаболитов в гомогенатах образцов биологических тканей крыс», опубликована на сайте журнала¹⁰).

Линейность калибровочных кривых в экспериментах с использованием гомогенатов, полученных при добавке 10% раствора АА в объемном соотношении (раствор АА : гомогенат) 1:1, была доказана в диапазоне 20–20000 нг/г для TFISA, 2–2000 нг/г для М1 и 0,1–100,0 нг/г для М2 (табл. 2¹¹). Было проанализировано 6 серий образцов печени, поскольку на этой матрице было выполнено большее количество валидационных тестов. Гомогенаты почек, сердца, селезенки, легких, мозга, кожи и мышц были использованы для проведения трех серий валидационных исследований (внутрисерийные исследования правильности и прецизионности, селективность, долгосрочная стабильность). Средние значения наклонов калибровочных кривых, полученных на образцах исследуемых биологических объектов, были близки (табл. 2¹²).

Таким образом, по результатам испытаний селективности, линейности и эффекта матрицы значительных различий между гомогенатами разных органов, приготовленными с добавкой

⁷ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

⁸ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

⁹ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

¹⁰ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

¹¹ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

¹² <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

10% раствора АА в объемном соотношении (раствор АА : гомогенат) 1:1, не выявлено, поэтому объем дальнейших валидационных тестов был сокращен.

Оценка внутрисерийной правильности и прецизионности методики осуществлена путем анализа 2 валидационных серий для каждого вида биоматериала (печени, почек, селезенки, сердца, легких, мозга, кожи и мышц). Среднее значение относительной погрешности количественного определения (δ) TFISA, M1 и M2 в пробах с концентрациями НПКО, LQC, MQC, HQC составляло $\pm 15\%$. Значение RSD результатов на каждом уровне концентрации не превышало 15%. Межсерийная правильность и прецизионность рассчитана путем объединения данных, полученных в ходе всех 16 валидационных серий. Величина δ для TFISA составляла 0,73–2,42%, для M1 – 1,18–2,57%, для M2 – 0,90–1,89%. Значение RSD по результатам всех испытаний на каждом уровне концентрации не превышало 10,05% (табл. 3¹³).

Метрологические характеристики методики сохранялись на требуемом уровне после двукратного разведения гомогенатов печени с концентрацией Dil (табл. 1) чистым гомогенатом. Величина δ для TFISA, M1 и M2 составила –3,11; –2,44; –1,45% соответственно, а значение RSD рассчитанных концентраций не превышало 15%. Воспроизводимость результатов при повторном введении оценивали на образцах печени. Серия данных проб была успешно проанализирована через 48 ч после первой инъекции (табл. 3¹⁴).

Валидационные тесты для образцов глаза были проведены в полном объеме. Аналитический диапазон для определения TFISA, M1 и M2 составил 80–80000; 8–8000, 0,4–400,0 нг/г, соответственно. Результаты исследования селективности, прецизионности и правильности, эффекта разведения, воспроизводимости при повторном введении, эффекта матрицы соответствовали критериям приемлемости¹⁵ (табл. 4 «Результаты валидации методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в глазах крыс», опубликована на сайте журнала¹⁶).

Стабильность анализируемых веществ в метанольных гомогенатах с объемным соотношением 1:1 (раствор АА : гомогенат) в ходе валидационных тестов STS, FTS и ASS была подтверждена на образцах печени (табл. 5 «Исследование стабильности 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в гомогенатах органов крыс», опубликована на сайте журнала¹⁷). Относительная погрешность TFISA, M1 и M2 находились в пределах допустимого диапазона $\pm 15\%$ ¹. Результаты STS, FTS и ASS для образцов глаза (гомогенаты в соотношении 1:3 (масса ткани : объем метанола)) также были приемлемыми. Исследование стабильности в условиях длительного хранения (LTS) было успешно проведено для всех исследуемых органов и тканей. Качественные и количественные различия ферментативных систем и состава эндогенных соединений печени, почек, легких, головного мозга, сердца, селезенки, кожи, мышц, глаза не влияли на стабильность N-гидроксииметаболита.

Для исследования распределения TFISA в организме крыс были выбраны органы экскреции (печень и почки); органы с хорошей (сердце, легкие, селезенка), умеренной (мышцы), слабой васкуляризацией (кожа); места инстиляции и действия (глаза)¹⁸. Для оценки возможности проникновения через гематоэнцефалический барьер и взаимодействия с карбоангидразой в тканях центральной нервной системы проводили количественное определение аналитов в головном мозге крыс. Рассчитанные в ходе экспериментов значения фармакокинетических параметров изучаемых соединений представлены в таблице 6 «Фармакокинетические параметры 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в органах и тканях крыс» (опубликована на сайте журнала¹⁹).

TFISA хорошо распределяется по изучаемым органам и тканям. T_{max} в исследуемых объектах, за исключением глаз и кожи, достигается через 12 ч после введения препарата (рис. 4а «Фармакокинетические кривые 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида в органах и тканях крыс», опубликован на сайте журнала²⁰). Наибольшая

¹³ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

¹⁴ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

¹⁵ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

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

¹⁶ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

¹⁷ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

¹⁸ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

¹⁹ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

²⁰ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

концентрация TFISA в месте действия наблюдалась спустя 1 ч после введения, в течение последующего часа наблюдалось ее резкое снижение. Спустя 24–72 ч в пробах глаз фиксировались следовые количества TFISA, а спустя 72 ч содержание было ниже предела количественного определения методики (рис. 4b²¹). Наибольшая f_t действующего вещества выявлена в тканях глаз, а также в селезенке. Высокие величины f_t наблюдали в хорошо васкуляризованных органах – сердце и легких, низкие величины f_t – в тканях с умеренным и слабым кровотоком – мышцах и коже (рис. 3).

Максимальная концентрация N-гидроксипроизводного TFISA в изучаемых биопробах, в том числе в месте введения, достигается спустя 12 ч после инстилляции. Раннего T_{max} у M1 в глазах не наблюдалось, в отличие от M2 (рис. 5a «Фармакокинетические кривые метаболитов 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида в органах и тканях крыс», опубликован на сайте журнала²²). Вероятно, ферментные системы данного органа не вносят значительный вклад в N-гидроксилирование сульфонидамидной группы TFISA, следовательно, данный метаболит преимущественно образуется в печени. Значение f_t M1 в органах и тканях в несколько раз выше, чем у действующего

вещества. Лучше всего N-гидроксиметаболит проникает в органы с хорошей васкуляризацией и интенсивным кровотоком – селезенку, легкие и сердце. Величина f_t N-гидроксипроизводного в печени и почках ниже: 39,8 и 26,8 соответственно. Основной метаболит также проходит через гематоэнцефалический барьер. Самое низкое значение f_t для данного соединения наблюдали в коже. В глаза M1 проникает хуже, чем TFISA: величина f_t M1 на ~30% ниже (табл. 6²³). Продолжительность периода полувыведения основного метаболита из изучаемых объектов также большая, за исключением глаз.

Величина T_{max} N-ацетилпроизводного TFISA в большинстве изучаемых органов и тканей достигается в точке 12 ч (рис. 5b²⁴), максимальная концентрация M2 в глазах достигается раньше – через 4 ч после инстилляции, а затем начинает резко снижаться (табл. 6²⁵) и через 24 ч M2 в месте введения не детектируется. Схожая ситуация наблюдалась в случае TFISA. Это может указывать на начало ацетилирования действующего вещества еще в тканях глаза. Так, в данном органе подтверждена высокая ферментативная активность как N-ацетилтрансферазы [23], так и S9-фракции [24]. После полного выведения из области нанесения суспензии ацетилирование TFISA продолжается в печени, поэтому

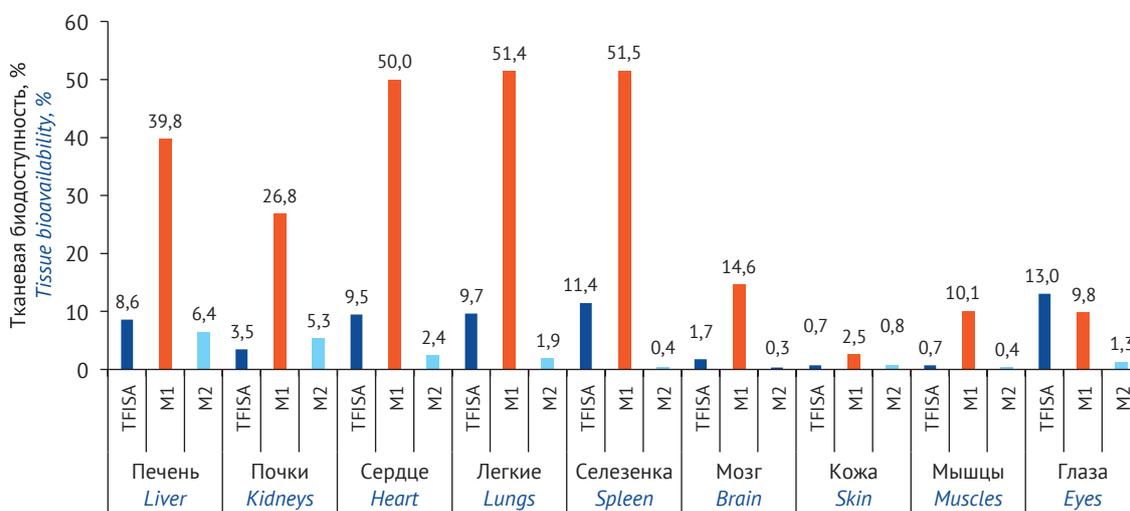


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Тканевая биодоступность 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его метаболитов. TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид

Fig. 3. Tissue bioavailability of TFISA and its metabolites. TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide

²¹ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

²² <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

²³ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

²⁴ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

²⁵ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

M2 обнаруживается в пробах печени, почек, а также сердца и легких на протяжении всего эксперимента. M2 после образования распределяется по организму крыс хуже, чем TFISA и M1. Наибольшая величина f_t у минорного метаболита наблюдалась в печени и почках. Значение f_t в селезенке у M2 одно из самых низких, в отличие от TFISA и M1. Так же плохо N-ацетилметаболит проникает в мышцы и головной мозг. Период полувыведения N-ацетилпроизводного длительный только в органах, в которых наблюдали высокие величины f_t более 1,9.

Для TFISA и его метаболитов характерен длительный период полувыведения из изученных органов и тканей, как и из биологических жидкостей [2]. Это вызвано накоплением в эритроцитах действующего вещества. Так, f_t для крови у TFISA и у M1 составляет около 50, а у M2 – около 2 (рассчитано по данным [2, 3]). Время достижения максимальной концентрации действующего вещества в исследуемых биообъектах наступало спустя 12 ч после введения (рис. 4²⁶), что значительно позже, чем в биологических жидкостях крыс. Вероятно, TFISA постепенно высвобождается из эритроцитов и проникает в органы и ткани, особенно с интенсивным кровотоком. В точке 12 ч также наблюдали C_{max} метаболита M1, что связано с повышением экспозиции TFISA в печени (рис. 5²⁷). При этом N-гидроксиметаболит попадает в кровь и в хорошо васкуляризованные органы в сопоставимых количествах [2].

N-ацетилпроизводное, вероятно, образуется уже в месте инстилляции. Его накопление не происходит из-за сравнительно низкого сродства к эритроцитам и быстрого выведения с мочой. Так, максимальная скорость его реанальной экскреции приходилась на промежуток 4–12 ч после инстилляции [2]. Резкое падение концентрации и отсутствие M2 в пробах тканей глаз спустя 24 ч после введения (рис. 5b²⁸) указывает на то, что N-ацетилметаболит не попадает обратно в ткани из системного кровотока. Величина f_t M2 в хорошо васкуляризованных органах значительно ниже, чем у TFISA и M1. Наибольшая экспозиция данного соединения зафиксирована в органе образования – печени и органе выведения [2] – почках.

Таким образом, TFISA и его основной метаболит M1 интенсивно распределялись в ряд органов и тканей. В глазах концентрации действующего вещества свыше 3000 нг/г сохраняются в течение 12 ч после закапывания глазной суспензии. Фармакологический эффект сохраняется даже при следовых количествах TFISA в точке 24 ч [1], что позволяет использовать данный препарат 1 раз в сутки. Тканевая биодоступность M2 в соответствующих объектах хуже, чем у TFISA и M1. Наибольшее содержание N-ацетилметаболита выявлено в органах экскреции – печени и почках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные биоаналитические методики количественного определения TFISA и его метаболитов были успешно валидированы и использованы для определения содержания действующего вещества и его метаболитов в органах и тканях крыс. Установлена необходимость стабилизации проб путем немедленной обработки метанолом с последующим добавлением водных растворов аскорбиновой кислоты для предотвращения разложения N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида. Концентрации действующего вещества и его N-гидроксипроизводного в сердце, легких, селезенке, имеющих хорошую васкуляризацию и интенсивный кровоток, выше, чем в органах экскреции, что может быть связано с их накоплением в эритроцитах. Для лекарственных средств местного действия это является нежелательным явлением, однако в случае репозиционирования 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида длительный период полувыведения позволит увеличить интервалы между приемами. Для N-ацетилметаболита, который менее склонен к депонированию, наибольшее содержание наблюдали в печени и почках.

Таким образом, в рамках выполненного цикла исследований выявлены особенности фармакокинетики 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида у крыс при однократном введении. Задачами дальнейшего изучения являются оценка кумуляции данного соединения после многократного применения, а также изучение системной экспозиции на втором виде животного – кроликах.

²⁶ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

²⁷ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

²⁸ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Хохлов АЛ, Шетнев АА, Корсаков МК, Федоров ВН, Тюшина АН, Вольхин НН, Вдовиченко ВП. Фармакологические свойства производных сульфонамидов – новых ингибиторов карбоангидразы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2023;175(2):166–70. Khokhlov AL, Shetnev AA, Korsakov MK, Fedorov VN, Tyushina AN, Volkhin NN, Vdovichenko VP. Pharmacological properties of sulfonamide derivatives – new inhibitors of carbonic anhydrase. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2023;175(2):166–70 (In Russ.). <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-175-2-166-170>
2. Яичков ИИ, Хохлов АЛ, Корсаков МК, Вольхин НН, Петухов СС, Зайкова ВЕ, Лазарянец ОЭ. Изучение экскреции 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида на крысах. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(3). Yaichkov II, Khokhlov AL, Korsakov MK, Volkhin NN, Petukhov SS, Zaykova VE, Lasariants OE. Excretion study of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide in rats. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(3) (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-697>
3. Chen M, Jin J, Ji X, Chang K, Li J, Zhao L. Pharmacokinetics, bioavailability and tissue distribution of chitobiose and chitotriose in rats. *Bioresour Bioprocess*. 2022;9(1):13. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00500-y>
4. Sheng Y-H, Siemiątkowska A, Kosicka-Noworzyń K, Brunetti L, Kagan L. A validated LC-MS/MS method for simultaneous quantitation of piperacillin, cefazolin, and cefoxitin in rat plasma and twelve tissues. *J Pharm Biomed Anal*. 2024;248:116259. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2024.116259>
5. Hu H, Xiao H, Bao H, Li M, Xue C, Li YT, et al. Tissue distribution comparison of six active ingredients from an *Eucommia cortex* extract between normal and spontaneously hypertensive rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2020;2020:2049059. <https://doi.org/10.1155/2020/2049059>
6. Körmöczy T, Szabó Í, Farkas E, Penke B, Janáky T, Ilisz I, Berkecz R. Heart-cutting two-dimensional liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry for determination of *N,N*-dimethyltryptamine in rat plasma and brain; Method development and application. *J Pharm Biomed Anal*. 2020;191:113615. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113615>
7. Roseboom IC, Thijssena B, Rosinga H, Alvesb F, Mondalc D, Teunissen MBM, et al. Development and validation of an HPLC-MS/MS method for the quantification of the anti-leishmanial drug miltefosine in human skin tissue. *J Pharm Biomed Anal*. 2021;207:114402. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114402>
8. Eom HY, Jang S-I, Lee J-H. Development and validation of a bioanalytical method for 3'- and 6'-sialyllactose in minipig liver and kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to analysis of tissue distribution. *Molecules*. 2020;25(23):5721. <https://doi.org/10.3390/molecules25235721>
9. Liang D, Wu Z, Liu Y, Li C, Li X, Yang B, Xie H, Sun H. HPLC-MS/MS-mediated analysis of the pharmacokinetics, bioavailability, and tissue distribution of schisan-drol B in rats. *Int J Anal Chem*. 2021;2021:8862291. <https://doi.org/10.1155/2021/8862291>
10. Аладышева ЖИ, Беляев ВВ, Береговых ВВ, Брких ГЭ, Грейбо СВ, Демина НБ и др. *Промышленная фармацевция. Путь создания продукта*. М.: Российская академия наук; 2019. Aladysheva ZhI, Belyaev VV, Beregovykh VV, Brkich GE, Greibo SV, Demina NB, et al. *Industrial pharmacy. The way to create a product*. Moscow: Russian Academy of Sciences; 2019 (In Russ.). EDN: KWJJK
11. Попов НС, Гавриленко ДА, Балабаньян ВЮ, Петрова МБ, Донсков СА, Атаджанов ИБ, Шатохина НА. Количественное определение моноаминовых нейротрансмиттеров в гомогенатах головного мозга крыс с помощью ВЭЖХ-МС/МС. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(4):33–42. Popov NS, Gavrilenko DA, Balabanyan VYu, Petrova MB, Donskov SA, Atadzhanov IB, Shatokhina NA. Quantitative determination of monoamine neurotransmitters in rat brain homogenates using HPLC-MS/MS. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2022;(4):33–42 (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-33-42>
12. Barbosa da Silva Pereira HA, de Lima Leite A, Charone S, Vaz Madureira Lobo JG, Cestari TM, Peres-Buzalaf C, et al. Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride. *PLoS One*. 2013;8(9):e75343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075343>
13. Хохлов АЛ, Яичков ИИ, Корсаков МК, Каграманян ИН, Вольхин НН, Петухов СС, Зайкова ВЕ. Разработка и валидация методики количественного определения моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов в тканях мозга крыс с помощью ВЭЖХ-МС/МС. *Acta Biomedica Scientifica*. 2024;9(1):177–91. Khokhlov AL, Yaichkov II, Korsakov MK, Kagramanyan IN, Volkhin NN, Petukhov SS, Zaykova VE. Development and validation of a method for the quantitative determination of monoamine neurotransmitters and their metabolites in rat brain tissue using HPLC-MS/MS. *Acta Biomedica Scientifica*. 2024;9(1):177–91 (In Russ.). <https://doi.org/10.29413/ABS.2024-9.1.18>
14. Plate AYA, Crankshaw DL, Gallaher DD. The effect of anesthesia by diethyl ether or isoflurane on activity of cytochrome P450 2E1 and P450 reductases in rat liver. *Anesth Analg*. 2005;101(4):1063–4. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000166791.30963.ef>
15. Коптяева КЕ, Мужикян АА, Гушин ЯА, Беляева ЕВ, Макарова МН, Макаров ВГ. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных (крысы). *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018;(2):71–92. Koptyaeva KE, Muzhikyan AA, Guschin YaA, Belyaeva EV, Makarova MN, Makarov VG. Technique of dissection and extracting organs of laboratory animals. *Message 1 (rats)*. *Laboratory Animals for Science*. 2018;(2):71–92 (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/2618723X-2018-02-08>
16. Liang Y, Wang L, Zhang R, Pan J, Wu W, Huang Y, et al. Determination of the metabolites and metabolic pathways for three β -receptor agonists in rats based on LC-MS/MS. *Animals*. 2022;12(15):1885. <https://doi.org/10.3390/ani12151885>
17. Popovic MM, Schlenker MB, Thiruchelvam D, Redelmeier DA. Serious adverse events of oral and topical carbonic anhydrase inhibitors. *JAMA Ophthalmol*. 2022;140(3):235–42. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2021.5977>
18. Курышева НИ. Ингибиторы карбоангидразы в лечении глаукомы. Обзор. Часть 2. *Офтальмология*. 2020;17(4):676–82. Kuryshva NI. Carbonic anhydrase inhibitors in the treatment of glaucoma. Review. Part II. *Ophthalmology in Russia*. 2020;17(4):676–82 (In Russ.). <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2020-4-676-682>
19. Gu X-F, Mao B-Y, Xia M, Yang Y, Zhang J-L, Yang D-S, et al. Rapid, sensitive and selective HPLC-MS/MS method for the quantification of topically applied besifloxacin in rabbit plasma and ocular tissues: Application to a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;117:37–46. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.08.023>
20. Kim E, Jang E, Jung W, Kim W, Lee J, Choi DH, et al. Establishment of an LC-MS/MS method for quantification of lifitegrast in rabbit plasma and ocular tissues and its application to pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2023;1229:123892. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123892>

21. Amo EM, Hammid A, Tausch M, Toropainen E, Sadegh A, Valtari A, et al. Ocular metabolism and distribution of drugs in the rabbit eye: Quantitative assessment after intracameral and intravitreal administrations. *Int J Pharm.* 2022;613:121361. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121361>
22. Яичков ИИ, Корсаков МК, Вольхин НН, Петухов СС, Тюшина АН, Зайкова ВЕ, Лазарянц ОЭ. Изучение фармакокинетики нового производного 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамиды на крысах. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2024;13(4):238–50. Yaichkov II, Korsakov MK, Volkhin NN, Petukhov SS, Tyushina AN, Zaykova VE, Lasaraynz OE. Pharmacokinetic study of a new 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxamide derivative in rats. *Drug Development & Registration.* 2024;13(4):238–50 (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1876>
23. Al-Ghananeem AM, Crooks PA. Phase I and Phase II ocular metabolic activities and the role of metabolism in ophthalmic prodrug and codrug design and delivery. *Molecules.* 2007;12(3):373–88. <https://doi.org/10.3390/12030373>
24. Argikar UA, Dumouchel JL, Dunne CE, Saran C, Cirello AL, Mithat G. Ocular metabolism of levobunolol: Historic and emerging metabolic pathways. *Drug Metab Dispos.* 2016;44(8):1304–12. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.070458>

Дополнительная информация. На сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» размещены таблицы 2–6, рис. 1, 2, 4 и 5. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

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

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

Additional information. Tables 2–6, and Figures 1, 2, 4, 5 are published on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation.* <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-743-annex>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Ilya I. Yaichkov developed and validated the bioassay, analysed animal biomaterial samples, conducted statistical data processing, and drafted the manuscript. Alexander L. Khokhlov critically discussed the manuscript and approved the final version of the manuscript for publication. Mikhail K. Korsakov critically discussed and edited the manuscript. Nikita N. Volkhin, Sergey S. Petukhov, Olga E. Lazariants, and Alena V. Korovina worked with laboratory animals.

Ethics approval. This study was approved by the Ethics Committee at the Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky (Approval No. 2 of 10 October 2023).

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

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

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

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

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

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

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

Вольхин Никита Николаевич / Nikita N. Volkhin

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

Петухов Сергей Станиславович / Sergey S. Petukhov

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

Лазарянц Ольга Эммануиловна / Olga E. Lazariants

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1249-3669>

Корovina Алена Вадимовна / Alena V. Korovina

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-5743-6948>

Поступила 11.12.2024

После доработки 03.03.2025

Принята к публикации 16.04.2025

Online first 06.06.2025

Received 11 December 2024

Revised 3 March 2025

Accepted 16 April 2025

Online first 6 June 2025



О.В. Мушкина  ,
Н.С. Гурина 

Комплексная оценка противовоспалительного действия водных извлечений и гелей на основе листьев ольхи черной и ольхи серой *in vivo*

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
пр-т Дзержинского, д. 83, стр. 15, г. Минск, 220045, Республика Беларусь

✉ Мушкина Ольга Владимировна; org-pharmacei@bsmu.by

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Флавоноиды, содержащиеся во многих видах растений, ингибируют индукцию цитокинов и метаболитов арахидоновой кислоты, которые являются тканевыми медиаторами воспаления, проявляя, таким образом, противовоспалительное действие. Листья ольхи черной (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) и ольхи серой (*Alnus incana* (L.) Moench.) содержат флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества и могут быть рассмотрены как новый вид растительного лекарственного сырья, используемого для производства противовоспалительных лекарственных средств.

ЦЕЛЬ. Оценка противовоспалительного действия отваров и гелей, содержащих извлечения из листьев ольхи черной и ольхи серой, на лабораторных животных с использованием различных моделей воспаления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Противовоспалительную активность водных извлечений листьев ольхи черной и ольхи серой, а также гелей, содержащих их спиртовые извлечения, изучали на моделях генерализованного и локального воспаления, индуцированных введением крысам линии Wistar (самкам и самцам) раствора λ-каррагенана 1%. Оценку противовоспалительного действия при генерализованном воспалении проводили по биохимическим показателям крови (С-реактивный белок, аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, γ-глутаматтрансфераза), при локальном воспалении — по изменению объема и масс лап крыс.

РЕЗУЛЬТАТЫ. На модели генерализованного каррагенанового воспаления оценку эффективности водных извлечений листьев ольхи черной и серой проводили на 4 и 7 сутки после введения извлечений. Установлено, что статистически значимо происходило снижение уровня С-реактивного белка у животных, получавших настой листьев ольхи черной и ольхи серой внутривенно. На моделях локального каррагенанового воспаления установлено, что под действием настоев и гелей, содержащих биологически активные вещества листьев ольхи черной и серой, происходило статистически значимое снижение прироста массы и диаметров лап по сравнению с контрольными группами. Индекс ингибирования отека (рассчитанный по массе лап) гелем, содержащим настойку листьев ольхи черной на спирте этиловом 60%, составил 57,95% у самок и 56,53% у самцов; для геля, содержащего настойку листьев ольхи серой на 70% спирте этиловом, — 56,78% у самцов, 52,02% у самок.

ВЫВОДЫ. Доказана противовоспалительная активность водных и спиртовых извлечений из листьев ольхи черной и ольхи серой на моделях генерализованного и локального воспаления. Лекарственные формы (гели), содержащие спиртовые извлечения из листьев ольхи черной и ольхи серой, также обладают противовоспалительным действием в условиях индуцированного локального воспаления.

Ключевые слова: воспаление; С-реактивный белок; каррагенан; ольха черная; ольха серая; доклинические исследования; генерализованное воспаление; локальное воспаление; модели воспаления; крысы

Для цитирования: Мушкина О.В., Гурина Н.С. Комплексная оценка противовоспалительного действия водных извлечений и гелей на основе листьев ольхи черной и ольхи серой *in vivo*. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(3):313–321. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-313-321>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Н.С. Гурина является членом редколлегии журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» с 2024 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Olga V. Mushkina 
Natalia S. Gurina 

Integrated Assessment of the Anti-Inflammatory Effect *in Vivo* of Aqueous Extracts and Gels Based on Black Alder and Gray Alder Leaves

Belarusian State Medical University,
83/15 Dzerzhinsky Ave, Minsk 220045, Republic of Belarus

✉ **Olga V. Mushkina;** org-pharmacei@bsmu.by

ABSTRACT

INTRODUCTION. Flavonoids contained in many plant species inhibit the induction of cytokines and arachidonic acid metabolites, which are tissue mediators of inflammation, thus exhibiting an anti-inflammatory effect. The leaves of black and gray alder contain flavonoids, phenolic carboxylic acids, tannins and can be considered as a new type of herbal medicinal raw materials.

AIM. Evaluation of the anti-inflammatory effect of decoctions and gels containing the sum of biologically active substances of black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and gray alder (*Alnus incana* (L.) Moench.) leaves on laboratory animals using various models of inflammation.

MATERIALS AND METHODS. The anti-inflammatory activity of aqueous extracts of black alder and grey alder leaves, as well as gels containing their alcoholic extracts, was studied in models of generalized and local inflammation induced by the administration of a 1% λ -carrageenan solution to Wistar rats (female and male). The anti-inflammatory effect in generalized inflammation was assessed by blood biochemical parameters (C-reactive protein, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, γ -glutamate transferase), in case of local inflammation – by changes in the volume and mass of rat paws.

RESULTS. On the model of generalized carrageenan inflammation, the effectiveness of aqueous extracts of black and gray alder leaves was evaluated on days 4 and 7. It was found that introducing aqueous extracts determines a statistically significant decrease in the specific inflammation indicator – level of C-reactive protein in animals receiving an infusion of black alder and grey alder leaves of intragastric introduction. Using models of local carrageenan inflammation, it was established that under the influence of infusions and gels containing biologically active substances of black and gray alder leaves, there was a statistically significant decrease in the increase in weight and paw diameters compared to control groups. The edema inhibition index (calculated by weight) for the gel containing black alder leaf tincture based on 60% ethyl alcohol was the highest and amounted to 57.95% in females and 56.53% in males, for the gel containing grey alder leaf tincture based on 70% ethyl alcohol – 56.78% in males, 52.02% in females.

CONCLUSIONS. It has been proven the anti-inflammatory activity of aqueous and alcoholic extracts from black alder and gray alder leaves in models of generalized and local inflammation. Dosage forms (gels) containing alcohol extracts from the leaves of black alder and gray alder also have an anti-inflammatory effect in conditions of induced local inflammation. Also it has been proven the anti-inflammatory effect of biologically active substances of black alder and gray alder on laboratory animals using models of generalized and local inflammation.

Keywords: inflammation; C-reactive protein; carrageenan; black alder; grey alder; preclinical studies; generalized inflammation; local inflammation; inflammation models; rats

For citation: Mushkina O.V., Gurina N.S. Integrated assessment of the anti-inflammatory effect *in vivo* of aqueous extracts and gels based on black alder and gray alder leaves. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(3):313–321. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-313-321>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. Natalia S. Gurina has been a member of the Editorial Board of *Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2024. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Воспаление представляет собой физиологическую защитную реакцию соединительной ткани и неспецифичный ответ на повреждение различными факторами (бактериальные инфекции, вирусы, паразиты, токсины, высокие температуры, травмы и т.д.), является патогенетическим компонентом многих как острых, так и хронических заболеваний и проявляется рядом местных и системных клинических, биохимических и клеточных изменений, в совокупности называемых «реакция острой фазы». Острофазный ответ сопровождается нарастанием в плазме крови концентрации белков острой фазы, из которых самым чувствительным и диагностически значимым маркером воспаления является С-реактивный белок (СРБ). Синтез печеночного СРБ регулируется провоспалительными цитокинами, включая интерлейкины (IL) IL-6, IL-1 и фактор некроза опухоли α (TNF- α), поэтому практически любое неспецифическое повреждение ткани, инфекционный процесс, воспаление или стресс сопровождаются повышением уровня циркулирующего в крови СРБ¹ [1].

Флавоноиды – биологически активные вещества растительного происхождения – проявляют противовоспалительное действие, ингибируя индукцию цитокинов и метаболитов арахидоновой кислоты, которые являются тканевыми медиаторами воспаления. Таким образом, лекарственные растения, содержащие флавоноиды, могут быть потенциальными субстанциями для получения фитопрепаратов с противовоспалительным действием [2–5].

Листья ольхи черной (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) (ОЧ) и ольхи серой (*Alnus incana* (L.) Moench.) (ОС) – два новых вида лекарственного растительного сырья, включенных в Государственную фармакопею Республики Беларусь. Для расширения ассортимента лекарственных препаратов природного происхождения белорусского производства начато

формирование фармакологической доказательной базы для этих видов лекарственного растительного сырья. Установлено наличие в их составе флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ и тритерпеновых сапонинов, что послужило основанием для изучения противовоспалительной активности² [7–11]. Ранее было доказано и описано противовоспалительное действие водных извлечений листьев ОЧ и ОС при генерализованном воспалении [9].

Цель работы – оценка противовоспалительного действия отваров и гелей, содержащих извлечение из листьев ольхи черной и ольхи серой, на лабораторных животных с использованием различных моделей воспаления. Задачами исследования являются: моделирование локального и генерализованного воспалений у лабораторных животных, оценка действия препаратов для внутреннего и наружного применения на основе листьев ольхи черной и серой при различных моделях воспаления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились листья ОЧ и ОС, заготовленные в фазу завершения роста и вызревания листьев в различные годы на территории Витебской и Минской областей Республики Беларусь, высушенные в естественных условиях. Противовоспалительную активность листьев ОЧ и ОС изучали на моделях генерализованного и локального воспаления, индуцированных введением крысам 1% раствора λ -каррагенана (Sigma, кат. № 22049).

В экспериментах были использованы крысы обоих полов линии Wistar, массой 300 г \pm 5%, в возрасте 4–4,5 мес. (питомник «Рапполово», Ленинградская обл.). При проведении исследований соблюдали принципы биоэтики в соответствии со следующими регламентирующими документами: Международные рекомендации (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием

¹ Ярец ЮИ. Специфические белки. Практическое пособие для врачей. Гомель: ГУ «РНПЦ РМиЭЧ»; 2015.

² Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд. Т. 2. Минск; 2016.

Мушкина ОВ. Фармакогностический анализ листьев ольхи: дис. ... канд. фарм. наук. Витебск; 2008.

животных, Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях. Работа была рассмотрена на биоэтической комиссии (БЭК) УО «Белорусский государственный медицинский университет» и одобрена для проведения (протокол БЭК от 22.04.2015 № 21, БЭК от № 7 от 20.04.2021). Все исследования с лабораторными животными проводили в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей, а также Надлежащей лабораторной практикой: ТКП 125-2008 (02040).

Генерализованное воспаление индуцировали внутрибрюшинным введением крысам 1 мл раствора λ -каррагенана 1% на изотоническом растворе хлорида натрия (ОАО «Несвижский завод медицинских препаратов») [12, 13]. Все животные, использующиеся в этом эксперименте, были разделены на 5 групп по 16 самок и 16 самцов в каждой: группа И – интактные животные, группа В – контроль (воспаление без лечения), группы ОЧ и ОС – группы животных, которым через 2 ч после инъекции раствора λ -каррагенана и затем ежедневно в течение 7 сут внутрижелудочно вводили исследуемые препараты: соответственно, водные извлечения листьев ОЧ и листьев ОС в дозах 200 мг/кг, которые готовили путем нагревания на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин в соотношении сырье (г) : экстрагент (мл) 1:10, группа Д – животные, которым внутрижелудочно вводили препарат сравнения диклофенак натрия 8 мг/кг.

Для оценки противовоспалительной активности по 8 животных каждой группы выводили из эксперимента методом декапитации без предварительной наркотизации на 4 и 7 сутки эксперимента и определяли ряд показателей крови: С-реактивный белок (СРБ) спектрофотометрическим методом и активность индикаторных ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), γ -глутамат-трансферазы (ГГТ) с помощью диагностических наборов фирмы «Согтау» на автоматизированном фотометре РА 2600 [9].

Локальное каррагенановое воспаление индуцировали введением под плантарный (подошвенный) апоневроз правой задней лапы крысы 0,1 мл раствора λ -каррагенана 1%, приготовленного на изотоническом растворе³ [14]. В эксперимент было взято 24 самца и 24 самки, которых

разделили на 4 группы, в каждой по 6 самок и 6 самцов. Животным контрольной группы в течение 5 суток вводили воду очищенную, экспериментальные группы получали водные извлечения листьев ОЧ и ОС, полученные вышеописанным методом, внутрижелудочно в дозе 200 мг/кг в течение 5 сут. В качестве препарата сравнения использовали диклофенак натрия, который вводили в течение 5 сут внутрижелудочно в дозе 8 мг/кг (дозировка выбрана на основании работ [15–17] по исследованию противовоспалительной активности). Острое экссудативное воспаление животным всех групп вызывали на 5 сут эксперимента через 3 ч после последнего введения исследуемых препаратов. Через 3 ч после инъекции каррагенана животных умерщвляли в камере эвтаназии CL-1000 New с помощью углекислотного наркоза. Лапы ампутировали на уровне голеностопных суставов. Величину отека определяли по разности масс и диаметра воспаленной и невоспаленной лап.

Об интенсивности воспаления судили по приросту массы или диаметра лап на пике воспаления по формуле (1) и индексу ингибирования отека, характеризующего степени уменьшения отека, который рассчитывали по формуле (2) [9, 10]:

$$M_i = \frac{A_i - B_i}{B_i} \times 100\%, \quad (1)$$

$$I = \frac{M_{i_0} - M_i}{M_{i_0}} \times 100\%, \quad (2)$$

где M_i – прирост массы (диаметра), %; A_i – масса (диаметр) воспаленной лапы, г; B_i – масса (диаметр) здоровой лапы, г; I – индекс ингибирования отека на пике воспаления, %; M_{i_0} – прирост массы (диаметра) лапы в группе контроля, %.

На модели локального каррагенанового воспаления изучали противовоспалительную активность 4 мягких лекарственных форм (гелей), содержащих настойки на основе 30% спирта этилового из листьев ольхи черной (гель № 1-30ч), листьев ольхи серой (гель № 2-30с), а также настойку листьев ольхи черной на 60% спирте этиловом (гель № 3-60ч) и настойку листьев ольхи серой на 70% спирте этиловом (гель № 4-70с). В данном эксперименте животные были разделены на 8 групп в зависимости от препарата, которым обрабатывали суставы задних правых лап крыс, по 6 самок и 6 самцов в каждой (1 – контрольная, 2 – гель № 1-30ч, 3 – гель № 2-30с, 4 – гель № 3-60ч, 5 – гель № 4-70с,

³ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

6 – диклофенак, 7 – гель П30, 8 – гель П70). В контрольной группе обработку суставов не осуществляли. Исследуемые гели трижды наносили на заднюю правую лапу крыс: за 1 ч до индукции воспаления, через 1 и 2 ч после индукции воспаления. Через 3 ч после инъекции λ -каррагинана крыс выводили из эксперимента в камере эктаназии CL-1000 New с помощью углекислотного наркоза. Величину отека определяли по аналогии с предыдущим экспериментом⁴.

Для изготовления гелей, содержащих настойки на 30% спирте этиловом, в качестве гелеобразователя использовали гидроксипропилметилцеллюлозу (Tylopur). В состав гелей с настойками на 60 и 70% спирте этиловом входят вода, этилендиаминтетраацетат, карбомер, макрогол 400, пропиленгликоль, диэтанолламин [10, 15]. В качестве препарата сравнения использовали гель диклофенак 50 мг/г «Диклофенак форте», ООО «Фармтехнология», а также 2 геля-плацебо: гель П30 (содержит вспомогательные компоненты, аналогичные гелям № 1-30ч и 2-30с, и спирт этиловый 30%); гель П70 (содержит вспомогательные компоненты, аналогичные гелям № 3-60ч и 4-70с, и спирт этиловый 70%).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета «Statistica 10,0» с соблюдением общих рекомендаций для биологических исследований и пакета анализа Microsoft Excel 2016. При анализе использовали непараметрические методы, которые соответствовали критериям проводимого эксперимента: небольшая выборка животных в группах $n \leq 8(6)$, вид распределения неизвестен, медиана и мода значений не совпадали или не являлись близкими. Сравнение 3 и более групп между собой по количественным признакам выполняли с использованием критерия Краскела–Уоллиса (выполняли расчет параметра – тест статистика H), попарное сравнение двух независимых групп – с использованием непараметрического рангового U-критерия Манна–Уитни (выполняли расчет уровня значимости – p), для коррекции уровня значимости при попарном сравнении использовали поправку Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень СРБ у животных всех экспериментальных групп достоверно различался при измерении на 4 сут ($H_{\text{♀}}=23,43812$, $p=0,00001$; $H_{\text{♂}}=26,52140$, $p=0,00001$) и на 7 сут с начала эксперимента ($H_{\text{♀}}=26,10837$, $p=0,00001$; $H_{\text{♂}}=25,01778$,

$p=0,00001$). На модели генерализованного каррагенанового воспаления установлено, что статистически значимо происходит снижение специфического показателя воспаления СРБ по сравнению с контрольной группой воспаления на 4 и 7 сутки (В4 и В7) у животных, получающих настой листьев ОЧ на 4 сутки (самки, $p=0,0013$; самцы, $p=0,0013$), ОЧ на 7 сутки (самки, $p=0,0009$; самцы, $p=0,0009$), и ОС на 4 сутки (самки, $p=0,0074$; самцы, $p=0,0009$), ОС на 7 сутки (самки, $p=0,0007$; самцы, $p=0,0009$) (рис. 1).

Сравнение экспериментальных групп с применением критерия Краскела–Уоллиса выявило статистически значимые отличия на 4 сут ($H_{\text{♀}}\text{ГГТ}=16,37810$, $p=0,0009$; $H_{\text{♂}}\text{ГГТ}=20,70583$, $p=0,0001$; $H_{\text{♀}}\text{АЛТ}=20,25245$, $p=0,0002$; $H_{\text{♂}}\text{АЛТ}=20,64484$, $p=0,0001$; $H_{\text{♀}}\text{АСТ}=16,37810$, $p=0,0009$; $H_{\text{♂}}\text{АСТ}=13,58027$, $p=0,0035$). На 4 сут введение настоя листьев ОЧ приводило к статистически значимому снижению по сравнению с контрольной группой при попарном сравнении следующих показателей: ГГТ – на 51,23% (самки, $p=0,0074$) и 57,59% (самцы, $p=0,0009$); АЛТ – на 28,61% (самки, $p=0,0038$) и 35,02% (самцы, $p=0,0009$). Под действием настоев листьев ОС на 4 сут происходило статистически значимое снижение по сравнению с контрольной группой: ГГТ – на 52,74% (самки, $p=0,0074$) и 57,96% (самцы, $p=0,0009$); АЛТ – на 43,82% (самки, $p=0,0014$) и 37,22% (самцы, $p=0,0009$). Под действием препарата сравнения диклофенака натрия ГГТ снижался на 65,75% (самки, $p=0,0009$) и на 67,91% (самцы, $p=0,0009$); АЛТ – на 36,32% (самки, $p=0,0009$) и 38,99% (самцы, $p=0,0009$).

Попарное сравнение показателей экспериментальных групп спустя 7 сут после введения настоя выявило статистически значимые отличия ($H_{\text{♀}}\text{ГГТ}=11,96109$, $p=0,0075$; $H_{\text{♂}}\text{ГГТ}=11,72695$, $p=0,0084$; $H_{\text{♀}}\text{АЛТ}=12,67885$, $p=0,0054$; $H_{\text{♂}}\text{АЛТ}=13,20031$, $p=0,0042$; $H_{\text{♀}}\text{АСТ}=21,06423$, $p=0,0001$). Введение настоя листьев ОЧ и ОС животным приводило к статистически значимому снижению по сравнению с контрольной группой активности ГГТ на 62,37% (самки, $p=0,0074$) и 51,89% (самцы, $p=0,0063$) и на 53,41% (самки, $p=0,0100$) и 45,08% (самцы, $p=0,0157$) соответственно. Под действием препарата сравнения диклофенака активность ГГТ снижалась на 60,93% (самки, $p=0,0038$) и 51,13% (самцы, $p=0,0086$); АСТ – на 17,19% (самки, $p=0,0013$) и 19,31% (самцы, $p=0,0009$).

Таким образом выявлено, что отвары листьев ОЧ и ОС при внутрижелудочном введении

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

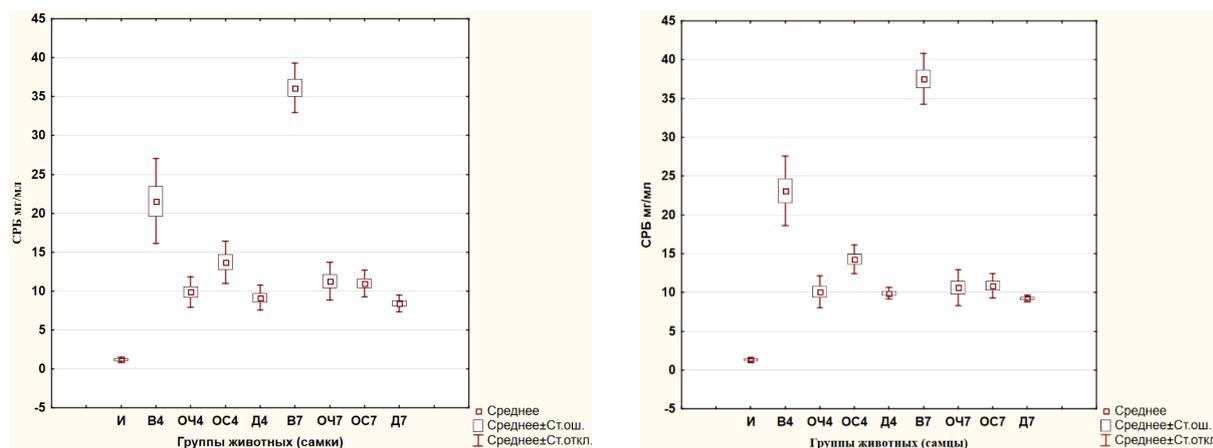


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Динамика изменения С-реактивного белка (СРБ) под действием извлечений из листьев ольхи черной и ольхи серой: а – самки, б – самцы. И – интактные животные; В4 – контрольная группа, на 4 сут; ОС4, ОС7 – группы, получающие извлечение из листьев ольхи серой, на 4 и 7 сут; ОЧ4, ОЧ7 – группы, получающие извлечение из листьев ольхи черной, на 4 и 7 сут; Д4, Д7 – группа, получающая диклофенак натрия, на 4 и 7 сут. Ст. ош. – стандартная ошибка, Ст. откл. – стандартное отклонение

Fig. 1. Dynamics of C-reactive protein (CRP) changes under the black alder and gray alder leaves extracts. И, intact animals; В4, the control group on the 4th day; ОС4, ОС7, the group receiving extraction from the leaves of grey alder on the 4th and 7th days; ОЧ4, ОЧ7, the group receiving extraction from the leaves of black alder on the 4th and 7th days; Д4, Д7, the group receiving diclofenac sodium on the 4th and 7th days; Cm. ow., standard error; Cm. откл., standard deviation

крысам обладали выраженной противовоспалительной активностью при генерализованном воспалении.

Анализ результатов действия извлечений листьев ОЧ и ОС на модели локального каррагенового воспаления с применением критерия

Краскела–Уоллиса выявил статистически значимые отличия приростов масс лап ($H_{\text{♀}}=13,83072$, $p=0,0031$; $H_{\text{♂}}=16,22205$, $p=0,001$) и диаметров лап ($H_{\text{♀}}=18,63621$, $p=0,0003$; $H_{\text{♂}}=14,74989$, $p=0,002$) по сравнению с контрольной группой, которая получала воду очищенную (табл. 1).

Таблица 1. Противовоспалительное действие водных извлечений листьев ольхи серой и ольхи черной при локальном каррагеновом воспалении (количество животных в каждой группе $n=6$)

Table 1. Anti-inflammatory effect of gray alder and black alder leaves aqueous extracts upon local carrageenan inflammation (number of animals in each group $n=6$)

Вводимое средство, доза, пол животного	Прирост массы лапы, $M_{\text{ср}} \pm \Delta M$, % Уровень значимости, p	Индекс ингибирования, %	Прирост диаметра лапы, $D_{\text{ср}} \pm \Delta D$, % Уровень значимости, p	Индекс ингибирования, %
Вода очищенная ♀	108,67±13,19	0	46,4±5,14	0
Отвар листьев ольхи черной 200 мг/кг ♀	31,35±4,07 $p=0,0051$	71,15	30,06±5,23 $p=0,0051$	35,21
Отвар листьев ольхи серой 200 мг/кг ♀	30,62±2,94 $p=0,0051$	71,82	25,58±3,3 $p=0,0051$	44,87
Диклофенак натрия 8 мг/кг ♀	27,77±2,86 $p=0,0051$	74,45	16,91±3,20 $p=0,0051$	63,55
Вода очищенная ♂	80,40±2,21	0	45,45±3,79	0
Отвар листьев ольхи черной 200 мг/кг ♂	27,56±3,06 $p=0,0051$	65,72	23,03±4,10 $p=0,0051$	49,33
Отвар листьев ольхи серой 200 мг/кг ♂	34,95 ±5,28 $p=0,0051$	56,52	23,14±2,60 $p=0,0051$	49,08
Диклофенак натрия 8 мг/кг ♂	25,27±1,82 $p=0,0051$	68,57	19,13±2,88 $p=0,0051$	57,91

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

Таблица 2. Противовоспалительное действие гелей, содержащих настойки из листьев ольхи серой и ольхи черной, при локальном каррагенановом воспалении (количество животных в каждой группе n=6)**Table 2.** Anti-inflammatory effect of gels containing gray alder and black alder leaves tinctures upon local carrageenan inflammation (number of animals in each group n=6)

Исследуемое средство	Пол животного	Прирост массы, Мср±ΔМ% Уровень значимости, p	Индекс ингибирования, %	Прирост диаметра, Дср±ΔД% Уровень значимости, p	Индекс ингибирования, %
Контроль (без лечения)	♀	75,11±3,98	0	48,31±3,02	0
	♂	77,17±3,77	0	42,03±3,36	0
Гель № 1-30ч	♀	35,47±2,93 p=0,0051	52,76	35,38±3,24 p=0,0051	26,76
	♂	34,41±2,53 p=0,0051	55,41	30,17±3,72 p=0,0051	28,22
Гель № 2-30с	♀	39,19±4,57 p=0,0051	47,92	34,79±2,46 p=0,0051	27,99
	♂	34,74±3,00 p=0,0051	54,98	33,23±4,76 p=0,0131	20,93
Гель № 3-60ч	♀	31,58±3,2 p=0,0051	57,95	33,60±1,57 p=0,0051	30,45
	♂	33,54±6,476 p=0,0051	56,53	32,68±5,26 p=0,0306	22,25
Гель № 4-70с	♀	36,04±3,29 p=0,0051	52,02	33,98±1,78 p=0,0051	29,66
	♂	33,35±2,12 p=0,0051	56,78	31,09±3,83 p=0,0051	26,03
Гель диклофенак натрия 5%	♀	24,14±2,09 p=0,0051	67,86	29,24±3,15 p=0,0051	39,47
	♂	23,19±2,71 p=0,0051	69,94	26,02±3,78 p=0,0051	38,09
Гель П30	♀	69,28±4,21 p=0,0894	7,76	44,09±2,09 p=0,0655	10,10
	♂	68,60±6,64 p=0,0926	11,10	39,88±4,70 p=0,6306	5,16
Гель П70	♀	67,96±4,19 p=0,04532	9,52	44,92±1,34 p=0,1734	7,02
	♂	70,72±6,35 p=0,1734	8,36	39,21±2,65 p=0,2979	6,71

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

Примечания. Гель № 1-30ч, гель № 2-30с содержат настойки на основе 30% спирта этилового из листьев ольхи черной и серой соответственно; гель № 3-60ч – настойку листьев ольхи черной на основе 60% спирта этилового; гель № 4-70с – настойку листьев ольхи серой на основе 70% спирта этилового; гель П30 – вспомогательные компоненты, аналогичные гелю №1-30ч и гелю № 2-30с, и спирт этиловый 30%; гель П70 – вспомогательные компоненты, аналогичные гелю № 3-60ч и гелю № 4-70с, и спирт этиловый 70%.

В таблице 2 представлены результаты оценки противовоспалительного действия гелей, содержащих настойки листьев ОЧ и ОС, на модели локального каррагенанового воспаления. Сравнение экспериментальных групп с применением критерия Краскела–Уоллиса выявило статистически значимые отличия приростов масс (М) и диаметров (д) лап при применении гелей № 1-30ч, № 2-30с, П30 и геля диклофенака (Н♀м=25,95269, p=0,0000; Н♂м=25,67312,

p=0,003, Н♀д=22,14344, p=0,0002; Н♂д=19,11310, p=0,0007), а также гелей № 3-60ч, № 4-70с, П70 и диклофенака (Н♀м=25,87957, p=0,0000; Н♂м=24,98495, p=0,0001, Н♀д=21,61240, p=0,0002; Н♂д=18,48856, p=0,001).

При применении гелей на основе настоек из листьев ОЧ и ОС прирост массы и диаметра воспаленных лап был статистически значимо меньше, чем в контрольной группе животных

и в группах, где применялись гели-плацебо (табл. 2). При этом индекс ингибирования (рассчитанный по массе) для геля, содержащего настойку листьев ОЧ на спирте этиловом 60%, был максимальным и составил 57,95% (самки) и 56,53% (самцы). Данный показатель был аналогичным 56,78% (самцы) для геля, содержащего настойку листьев ОС на спирте этиловом 70%. Индекс ингибирования при использовании геля диклофенака 50 мг/г составил 67,86% (самки) и 69,94% (самцы). Приросты массы и диаметра лап при использовании гелей-плацебо статистически значимо не отличались от соответствующих приростов в контрольной группе.

ВЫВОДЫ

Таким образом, доказана противовоспалительная активность водных и спиртовых

извлечений из листьев ольхи черной и ольхи серой на моделях генерализованного и локального воспаления у крыс. Водные извлечения в дозе 200 мг/кг при внутрижелудочном введении статистически значимо снижали уровень специфического показателя воспаления — СРБ на 4 и 7 сутки воспаления по сравнению с контрольной группой. Внутрижелудочное введение отваров из листьев ольхи черной и серой в дозе 200 мг/кг, а также наружное применение гелей, содержащих спиртовые извлечения листьев ольхи черной на основе 30 и 60% спирта этилового и листьев ольхи серой на основе 30 и 70% спирта этилового, вызвало статистически значимое угнетение отека лап при локальном воспалении суставов лап крыс.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Морозов АМ, Сороковикова ТВ, Жуков СВ, Морозова АД, Рыжова ТС, Муравлянцева ММ и др. Актуальные маркеры воспаления в клинической практике. *Современные проблемы науки и образования*. 2022;(3):142–52. Morozov AM, Sorokovikova TV, Zhukov SV, Morozova AD, Ryzhova TS, Muravlyantseva MM, et al. Current markers of inflammation in clinical practice. *Modern Problems of Science and Education*. 2022;(3):142–52 (In Russ.). <https://doi.org/10.17513/spno.31653>
2. Mahesh G, Ramkanth S, Mohamed Saleem TS. Anti-inflammatory from medicinal plants — A comprehensive review. *Int J Rev Life Sci*. 2011;1(1):1–10.
3. Hošek J, Šmejkal K. Flavonoids as anti-inflammatory agents. In: Parnham M, ed. *Encyclopedia of inflammatory diseases*. Basel; 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0620-6_19-1
4. Çiğdem A, Ipek S, Levent A, Hikmet K, Esra Küpeli A. Phytochemical and biological studies on *Alnus glutinosa* subsp. *glutinosa*, *A. orientalis* var. *orientalis* and *A. orientalis* var. *pubescens* leaves. *J Ethnopharmacology*. 2016;192:148–60. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.007>
5. Азарова ОВ, Галактионова ЛП. Флавоноиды: механизм противовоспалительного действия. *Химия растительного сырья*. 2012;(4):61–78. Azarova OV, Galaktionova LP. Flavonoids: anti-inflammatory mechanism. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2012;(4):61–78 (In Russ.). EDN: [PWEASP](https://doi.org/10.3390/plants11192499)
6. Smeriglio A, D'Angelo V, Cacciola A, Ingegneri M, Raimondo FM, Trombetta D, Germanò MP. New insights on phytochemical features and biological properties of *Alnus glutinosa* stem bark. *Plants (Basel)*. 2022;11(19):2499. <https://doi.org/10.3390/plants11192499>
7. Нестеров ГВ, Литвинова ТМ, Матвеев ВН, Нестерова НВ, Сулейманова ФШ. Идентификация и количественное определение тритерпеновых сапонинов в соплодиях и листьях ольхи различных видов. *Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия*. 2022; 63(1):76–82. EDN: [YIMBDU](https://doi.org/10.3103/s0027131422010060). Nesterov GV, Litvinova TM, Matveenko VN, Nesterova NV, Suleymanova FSh. Identification and quantitation of triterpene saponins in infructescences and leaves of different alder species. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2022;77(1):56–9. <https://doi.org/10.3103/s0027131422010060>
8. Мушкина ОВ, Гурина НС, Крылов АЮ. Гистологическая характеристика регенерации тканей при лечении экспериментальной плоскостной раны гелями на основе листьев ольхи черной и листьев ольхи серой *Вестник ВГМУ*. 2024;23(4):113–22. Mushkina OV, Gurina NS, Krylov AYU. Histological characteristics of tissue regeneration in the treatment of experimental planar wounds with gels based on black alder leaves and gray alder leaves. *Bulletin of the VSMU*. 2024;23(4):113–22 (In Russ.). <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2024.4.113>
9. Мушкина ОВ, Гурина НС. Влияние экстрактов из листьев ольхи серой и ольхи черной на биохимические показатели крови при генерализованном воспалении. *Вестник Витебского государственного университета*. 2010;(5):45–8. Mushkina OV, Gurina SA. The effect of extracts from the leaves of gray alder and black alder on the biochemical parameters of blood in generalized inflammation. *Bulletin of the Vitebsk State University*. 2010;(5):45–8 (In Russ.). EDN: [MWBWTN](https://doi.org/10.1186/s40816-021-00299-9)
10. Mushkina V. Effect of wound healing in gels containing tinctures of *Alnus glutinosa* (L) leaves *Clin Phytosci*. 2021; 7(1):62. <https://doi.org/10.1186/s40816-021-00299-9>
11. Мушкина ОВ, Кравцова-Кухмар НГ, Гурина НС, Шаковец НВ, Кидясова ТВ. Применение фитогеля с настойкой листьев ольхи черной при экспериментальном гингивите. *Вестник ВГМУ*. 2022;21(3):113–22. Mushkina OV, Kravtsova-Kukhmar NG, Gurina NS, Shakovets NV, Kidyasova TV. The use of phytogel with tincture of black alder leaves in experimental gingivitis. *Bulletin of the VSMU*. 2022;21(3):113–22 (In Russ.). <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2022.3.94>
12. Barth CR. Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. *Eur J Immunol*. 2016;46(4):964–70. <https://doi.org/10.1002/eji.201545520>
13. DeSimone JM, Meguid MM, Kurzer MJ Westervel J. Indomethacin decreases carrageenan-induced peritoneal adhesions. *Surgery*. 1988;104(4):788–95. [https://doi.org/10.1016/s0002-9610\(97\)00232-8](https://doi.org/10.1016/s0002-9610(97)00232-8)
14. Махмудова ОА, Авхадиева ГФ, Хазиахметова ВН, Никитин ДО, Семина ИИ. Экспериментальное изучение противовоспалительной активности диклофенака в сверхмалых дозах на модели острого каррагенинового воспаления. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(2):20–25. Makhmudova OA, Avkhadiyeva GF, Khaziakhmetova VN, Nikitin DO, Semina II. Experimental study of the anti-inflammatory activity of diclofenac in

- ultra-low doses on a model of acute carrageenan inflammation. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(2):20–25 (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-20-25>
15. Мушкина ОВ. *Неклинические методы оценки фармакологической активности растительного сырья*. Минск: БГМУ; 2024. Mushkina OV. *Non-clinical methods for assessing the pharmacological activity of plant raw materials*. Minsk: BSMU; 2024 (In Russ.).
 16. Горбатюк НО, Черников МВ, Терехов АЮ. Изучение активности суммы тритерпеновых кислот из плодов облепихи и клюквы на модели хронического воспаления. *Вестник новых медицинских технологий*. 2015;(2):85–7. Gorbatyuk NO, Chernikov MV, Terekhov AYU. Study of the activity of the sum of triterpenic acids from sea buckthorn and cranberry fruits on the model of chronic inflammation. *Bulletin of new Medical Technologies*. 2015;(2):85–7 (In Russ.). EDN: [SCBRTJ](#)
 17. Гарсия ЕР, Поздняков ДИ, Шамилов АА, Коновалов ДА. Противовоспалительная и анальгетическая активность извлечений из травы татарника колючего. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2020;(3):39–43. Garcia ER, Pozdnyakov DI, Shamilov AA, Konovalov DA. Anti-inflammatory and analgesic activity of extracts from the herb thornberry. *Volgograd Science Medical Journal*. 2020;(3):39–43 (In Russ.). EDN: [KVGKAC](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: О.В. Мушкина – работа с источниками литературы, проведение эксперимента, формулировка выводов, написание текста рукописи, концепция работы, постановка задачи; Н.С. Гурина – методическое руководство, участие в формулировании выводов, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Соответствие принципам этики. Авторы заявляют, что все исследования одобрены этической комиссией УО «Белорусский государственный медицинский университет» (протоколы № 7 от 20.04.2021, № 21 от 22.04.2015).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Olga V. Mushkina* – work with literature sources, conducting an experiment, formulating conclusions, writing the text of the manuscript, concept of work, statement of the problem. *Natalia S. Gurina* – methodological guide, participation in the formulation of conclusions, approval of the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. According to the authors, the studies have been approved by the ethical commission of the Belarusian State Medical University (Protocol No. 7 dated 20.04.2021, No.21 dated 22.04.2015).

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Мушкина Ольга Владимировна, канд. фарм. наук, доцент / **Olga V. Mushkina**, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3397-1220>

Гурина Наталия Сергеевна, д-р биол. наук, профессор / **Natalia S. Gurina**, Dr. Sci. (Biol.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-9150-5728>

Поступила 21.02.2024

После доработки 03.04.2025

Принята к публикации 16.04.2025

Received 21 February 2025

Revised 3 April 2025

Accepted 16 April 2025



С.И. Кулешова ✉ 
М.Л. Горюнова 
О.Н. Высочанская 

Методы определения невидимых частиц в лекарственных средствах (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

✉ Кулешова Светлана Ивановна; Kuleshova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Современные методы определения размеров частиц с необходимой достоверностью позволяют изучить гранулометрический состав лекарственных средств и оценить потенциальные риски при медицинском применении лекарственных препаратов в случае наличия невидимых частиц, особенно это необходимо по отношению к инъекционным, ингаляционным, офтальмологическим формам лекарственных средств. Каждый из известных методов имеет свои особенности и сферу применения.

ЦЕЛЬ. Систематизация методов определения размеров невидимых частиц в лекарственных средствах.

ОБСУЖДЕНИЕ. В работе рассмотрены наиболее часто используемые методы определения размеров частиц и распределения частиц по размерам. Метод лазерной дифракции используется для определения общего количества частиц в образце и распределения частиц по размерам как по общему объему всех частиц, так и по общему количеству всех частиц. Метод динамического рассеяния света — для оценки размеров невидимых диспергированных частиц, взвешенных в растворе. Оба метода основаны на использовании лазерного излучения, рассеянного частицами испытуемого образца, при этом принципы работы оборудования различны. Для определения невидимых частиц, наличие которых нежелательно в лекарственных средствах, предусмотрены счетно-фотометрический метод и метод микроскопии. Метод микроскопии, основанный на подсчете невидимых частиц на поверхности высушенного мембранного фильтра после пропускания через мембрану растворов лекарственных препаратов, используется для определения посторонних невидимых частиц в случае невозможности применения счетно-фотометрического метода. Микроскопический метод с визуализацией потока и метод сканирующей электронной микроскопии не используются для рутинного контроля лекарственных средств, а являются важными дополнительными инструментами для определения особенностей гранулометрического состава и выявления нежелательной контаминации посторонними частицами в лекарственных средствах.

ВЫВОДЫ. Выбор метода зависит от задачи и объекта исследования. При применении каждого из рассмотренных методов следует учитывать тип и размер частиц, технологию лекарственного средства, физико-химические свойства испытуемого образца, скорость анализа, требования к точности метода, наличие оборудования и программного обеспечения, компетенцию персонала. В ряде случаев требуется комбинирование разных методов для получения наиболее достоверных результатов или применение наиболее универсальных способов, в частности микроскопического метода с визуализацией потока, который позволит определить размер, форму, природу невидимых частиц и содержание частиц конкретного размера в общем количестве.

Ключевые слова: невидимые частицы; лазерная дифракция; динамическое рассеяние света; оптическая микроскопия; микроскопия с визуализацией потока; сканирующая электронная микроскопия; размер частиц; контроль качества; лекарственные формы

Для цитирования: Кулешова С.И., Горюнова М.Л., Высочанская О.Н. Методы определения невидимых частиц в лекарственных средствах (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(3):322–329. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-322-329>

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  ,
Maria L. Goryunova  ,
Olga N. Vysochanskaya 

Methods for Detecting Subvisible Particles in Medicines (Review)

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

✉ Svetlana I. Kuleshova; Kuleshova@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Modern methods for determining particle sizes with the necessary reliability make it possible to study the granulometric composition of medicines and to assess the potential risks in the medical use of medicines in the presence of subvisible particles. This is especially necessary in relation to injectable, inhalation, ophthalmic forms of medicines. Each of the known methods has its own characteristics and the scope of its application.

AIM. Systematization of methods for determining the size of subvisible particles in medicines.

DISCUSSION. The paper considers the most commonly used methods for determining the size of subvisible particles and particle size distribution. The paper considers the most commonly used methods for determining the size of subvisible particles and particle size distribution. The laser diffraction method is used to determine the total number of particles in a sample and the particle size distribution of both the total volume of all particles and the total number of all particles. Dynamic light scattering is mainly used to estimate the size of subvisible dispersed particles suspended in solution. Both methods are based on the use of laser light scattered by particles of the test sample, while the principles of operation of the equipment are different. To identify subvisible particles, the presence of which is undesirable in medicines, the counting light blocking method and the microscopy method are provided. The microscopy method, based on counting subvisible particles on the surface of a dried membrane filter after passing drug solutions through the membrane, is used to identify subvisible particles if the counting light blocking method cannot be used. The microscopic method with flow visualization and the scanning electron microscopy method are not used for routine control of medicines, but are important additional tools for determining the features of the granulometric composition and detecting undesirable contamination by foreign particles in medicines.

CONCLUSION. The choice of method depends on the task and the object of the study. When applying each of the considered methods, the type and size of particles, the technology of the drug, the physico-chemical properties of the test sample, the speed of analysis, the requirements for the accuracy of the method, the availability of equipment and software, and the competence of personnel should be taken into account. In some cases, it is necessary to combine different methods to obtain the most reliable results or to use the most universal methods, in particular, the microscopic method with flow visualization, which will determine the size, shape, and nature of subvisible particles and the content of particles of a specific size in total.

Keywords: subvisible particles; laser diffraction (LD); dynamic light scattering (DLS); optical microscopy (MM); microscopic method with flow visualization (FI); scanning electron microscopy

For citation: Kuleshova S.I., Goryunova M.L., Vysochanskaya O.N. Methods for detecting subvisible particles in medicines (review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(3):322–329. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-322-329>

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

Современные методы определения размеров частиц (мельчайших фрагментов вещества с определенными физическими границами) с необходимой достоверностью позволяют определить гранулометрический состав лекарственных средств и оценить потенциальные риски при медицинском применении лекарственных препаратов в связи с наличием невидимых частиц, особенно это необходимо применительно к инъекционным, ингаляционным, офтальмологическим формам лекарственных средств¹. Выделяют два подхода к оценке качества лекарственных средств по количеству частиц: распределение фракционного состава (распределение частиц по размеру) активных ингредиентов, гранул и капель, суспензий как физической характеристики, которая влияет на такие параметры, как эффективность доставки (ингаляторы), биодоступность активного вещества, прочность, текучесть, стабильность эмульсии или суспензии, вязкость (назальные спреи), безопасность применения, однородность содержимого дозы, седиментационная устойчивость суспензий и их стабильность² [1], и оценка содержания посторонних частиц, содержание которых регламентируется в зависимости от их размеров. Контаминация посторонними невидимыми частицами лекарственных препаратов может приводить к негативным последствиям при их применении, выражающимся в нежелательных реакциях, вплоть до патологических изменений в организме больного человека, при попадании в кровяное русло способствует нарушению кровотока, вызывая гранулемы и тромбозы [2–6]. В ведущих фармакопеях представлен ряд монографий, в которых регламентируются содержание и распределение по размерам невидимых частиц (не более 100 мкм) в лекарственных средствах и приводятся методы определения этих параметров³.

Невидимые частицы разделяют на внешние посторонние, внутренние (специфические) включения и включения, связанные с физическими свойствами лекарственного средства, например

в препаратах белковой природы (феномен ассоциации белков)⁴.

Цель работы – систематизация методов определения размеров невидимых частиц в лекарственных формах.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Наиболее часто используемыми методами оценки лекарственных средств по содержанию частиц и их распределению являются метод лазерной дифракции (ЛД), метод динамического рассеяния света (ДРС), оптическая микроскопия в разных модификациях (ММ) и метод светоблокировки (счетно-фотометрический метод, СФМ). Все перечисленные методы фармакопейные и включаются в спецификации, если это предусмотрено стандартом качества для конкретного лекарственного средства.

Методы ЛД и ДРС в основном используются для определения среднего размера частиц, оценки распределения частиц по размерам, что позволяет оценить гранулометрический состав как готовой лекарственной формы, так и ингредиентов, в том числе фармацевтических субстанций⁵. Оба метода основаны на использовании лазерного света, рассеянного частицами испытуемого образца, однако физико-химические принципы, на которых они основаны, различны, что подразумевает использование разного оборудования [7].

ЛД – это статистический метод, который определяет размер не каждой отдельной частицы, а совокупности всех частиц в пробе, основанный на определении зависимости угла дифракции от размера частиц при воздействии лазерного облучения на диспергированный образец. Угол дифракции и интенсивность рассеянного света зависят от размера частиц. Более мелкие частицы рассеивают лазерный свет под большими углами со слабой интенсивностью, а более крупные – под малыми углами с более сильной интенсивностью. В результате анализа получают интегральное распределение частиц по размерам. Для преобразования

¹ ISO 22412:2017 Particle size analysis – Dynamic light scattering (DLS).

² ISO 9276-2:2014 Гранулометрический анализ. Представление результатов. Часть 2: Расчет средних размеров, диаметров частиц и моментов по распределению частиц по размерам.

³ ОФС.1.4.2.0006 Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

5.7 Test for particulate contamination, 5.7.1 Subvisible particles. International Pharmacopoeia. 12th ed. 2025.

2.9.19 Particulate contamination: sub-visible particles. European Pharmacopoeia 11.8.

2.9.53 Particulate contamination: sub-visible particles in non – injectable liquid preparation. European Pharmacopoeia 11.8.

<1788> Methods for the determination of subvisible particulate matter. United States Pharmacopoeia USP–NF/PF; 2024.

⁴ <430> Particle size analysis by dynamic light scattering. United States Pharmacopoeia USP–NF/PF; 2024.

⁵ <430> Particle size analysis by dynamic light scattering. United States Pharmacopoeia USP–NF/PF; 2024.

<1788> Methods for the determination of subvisible particulate matter. United States Pharmacopoeia USP–NF/PF; 2024.

2.9.31 Particulate size analysis laser light diffraction. European Pharmacopoeia 11.8.

используются математические модели, которые должны быть указаны в методиках, наиболее часто используемыми из них являются аппроксимация Фраунгофера и теория Ми. Аппроксимация Фраунгофера в основном подходит для непрозрачных и крупных частиц более 25 мкм⁶ [8]. Теория Ми позволяет получить более точные результаты для частиц различных размеров (от мм до нм), помимо самой дифракции учитывает еще рассеяние и поглощение, что делает результаты исследования зависимыми от значения комплексного показателя преломления исследуемых частиц и среды диспергирования, которые должны быть указаны в нормативных документах⁷. На основании полученных данных строится кумулятивная кривая, что позволяет получить общее распределение, способ графического оформления результатов описан в документе International Council for Harmonisation (ICH)⁸.

В нормативных документах, как правило, результаты измерений представляют в виде процентильных значений, которые принято обозначать буквой D или X. Обычно указываются значения D₁₀, D₅₀ и D₉₀. D₅₀ является медианным диаметром и обозначает, какой диаметр имеют не менее 50% всех частиц в исследуемом образце. D₁₀ и D₉₀ – размер частиц, соответствующий объемной доле частиц 10 и 90% соответственно. Промышленными приборами предусмотрены два способа оценки распределения частиц по размерам: от общего объема всех частиц и от общего количества всех частиц. В нормативных документах в основном нормируется объемное распределение частиц по размерам⁹.

Преимущества метода ЛД – точное определение широкого диапазона размеров частиц от нм до мм, универсальность, высокая пропускная способность в сочетании с достаточно коротким временным промежутком анализа одной пробы. Ограничение метода обусловлено особенностями работы приборов, конструкция которых предусматривает, что все частицы обладают сферической формой, поэтому если

исследуемый образец имеет игольчатую форму, частица будет интерпретироваться либо как «крупная», либо как «мелкая» в зависимости от ориентации частицы, проходящей через лазерный луч¹⁰.

Метод ДРС используется для определения размеров частиц, диспергированных в растворе, которые в процессе броуновского движения взаимодействуют с лазерным лучом. Стандарт ISO 22412:2017 для определения среднего гидродинамического размера частиц и распределения по размерам частиц преимущественно субмикронных, эмульсий или мелких пузырьков, диспергированных в жидкостях, рекомендует применение метода динамического рассеяния света (ДРС)¹¹. Частицы дисперсных систем (до ~2 мкм) подвержены постоянному хаотическому движению. Броуновское движение вызывает колебания интенсивности дифрагированного света. Возникающие колебания интенсивности измеряются под заданным углом при помощи детектора, который связывает их с размером частиц; более крупные частицы движутся медленнее мелких частиц, поэтому интенсивность рассеянного света в этом случае меняется с большей периодичностью¹². Метод ДРС в качестве основного используется для определения размера липидных капель в липидных инъекционных эмульсиях, для которых размер капель имеет решающее значение, так как капли размером свыше 5 мкм могут задерживаться в легких из-за механической фильтрации¹³. Настройки прибора и подготовка образцов для испытания зависят от концентраций суспензий¹⁴. Путем математических преобразований оценивается средний размер частиц в пробе и индекс полидисперсности, который характеризует диапазон распределения частиц. Результаты могут быть также выражены в процентильных значениях. Диапазон измерений методами ДРС и ЛД отчасти перекрывается, однако для анализа мельчайших частиц размером до 0,3 нм метод ДРС предпочтительнее, при этом концентрации испытуемых растворов могут быть от единиц ppm до 40 об.%. Преимуществом этого метода

⁶ ОФС.1.4.2.0008.15 Определение частиц по размеру методом лазерной дифракции света. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

⁷ ОФС 2.1.9.26 Определение размера частиц методом дифракции лазерного излучения. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. 1, ч. 2. М.; 2023.

⁸ ISO 9276-2 Representation of results of particle size analysis. Part 1: Graphical representation.

⁹ ОФС.1.4.2.0008.15 Определение частиц по размеру методом лазерной дифракции света. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

¹⁰ <https://www.microtrac.com/files/3682/comboination-of-laser-diffraction-and-image-analysis-ru.pdf>

¹¹ ISO 22412:2017 Particle size analysis – Dynamic light scattering (DLS).

¹² <430> Particle size analysis by dynamic light scattering. United States Pharmacopeia USP–NF/PF; 2024.

¹³ <729> Globule size distribution in lipid injectable emulsions. United States Pharmacopeia USP–NF/PF; 2024.

¹⁴ ISO 22412:2017 Particle size analysis – Dynamic light scattering (DLS).

является возможность измерения непосредственно в исследуемом образце и дополнительного учета дзета-потенциала¹⁵. Интерпретация результатов ДРС может осложняться, если в образце присутствуют конгломераты [9].

При использовании методов ЛД и ДРС для оценки качества лекарственного средства нормативные требования приводятся в спецификациях на конкретную лекарственную форму или анализируемый ингредиент, используемый при производстве препарата.

Метод светоблокировки (счетно-фотометрический метод, СФМ) основан на освещении участка детектора при прохождении разреженного потока частиц в жидкой суспензии между источником света и детектором. Например, в приборе НИАС (Beckman Coulter) для подсчета частиц в жидкостях источником света является лазерный диод, который освещает отдельные частицы в потоке для получения тени или блокировки освещения участка детектора¹⁶. Считается, что этот метод применим только для суспензий в концентрациях, позволяющих в один момент времени проходить через поток освещения (лазерный луч) только одной частице, коэффициент уменьшения интенсивности проходящего луча (Q) составляет ~ 2 . Такое значение Q наблюдается для сферических частиц диаметра ~ 10 мкм, коэффициент преломления которых отличается от коэффициента преломления матричной жидкости более чем на 0,1 [10]. Метод СФМ используется в основном для определения посторонних невидимых частиц в инъекционных препаратах, в лекарственных формах, предназначенных для имплантации, в офтальмологических растворах¹⁷. Объем проб, используемых в эксперименте, может варьировать от 0,1 до 25 мл [11]. В фармацевтической практике этот метод используется для определения количества невидимых посторонних частиц, размер которых находится в заданном диапазоне (как правило, 5, 10 и 25 мкм) и не предназначен для оценки распределения частиц по размерам. Преимуществами метода являются возможность

проведения эксперимента в течение короткого промежутка времени, минимальное участие оператора-экспериментатора, в большинстве случаев не требуются дополнительные химические реактивы. Недостатком данного метода является невозможность проведения испытания лекарственных средств в виде эмульсий, коллоидных и липосомальных препаратов, препаратов, при растворении которых образуются обильные воздушные или газовые пузырьки¹⁸.

Размер частиц, которые могут быть определены методом микроскопии (ММ), зависит от разрешающей способности микроскопа и обычно превышает 1 мкм. Микроскопы с общим увеличением более $\times 1500$ позволяют охарактеризовать объекты размером от 0,5 мкм с разрешением отдельных структур объекта до 0,1 мкм¹⁹. Для определения невидимых частиц используются несколько модификаций ММ: подсчет невидимых частиц на поверхности высушенного мембранного фильтра после пропускания через мембрану растворов лекарственных препаратов²⁰, микроскопический метод с визуализацией потока.

Для рутинного контроля лекарственных средств предусмотрен фармакопейный метод ММ. Исследование проводится с использованием бинокулярного микроскопа с увеличением $\times 100 \pm 10$, оснащенного откалиброванным микрометром и подставкой для размещения мембранного фильтра²¹. Для испытания также требуется фильтрационная установка с подходящим мембранным фильтром с размером пор не менее 1 мкм. Метод ММ предусмотрен для выявления посторонних (инородных) частиц, когда использование метода светоблокировки невозможно из-за природы лекарственного средства. Существенные недостатки данного способа – это трудности в подсчете частиц с низкой контрастностью, например частиц белка и частиц с незначительным рельефом поверхности. Метод ММ в большой степени зависит от подготовки операторов, которые осуществляют визуальный осмотр, от настройки микроскопа

¹⁵ <https://www.microtrac.com/ru/products/dynamic-light-scattering/>

¹⁶ <https://www.beckman.co.il/ru/resources/industry-standards/usp-787/light-obscuration-optical-method-for-particle-detection>

¹⁷ 5.7.1 Subvisible particles. International Pharmacopoeia. 12th ed. 2025.

2.9.19 Particulate contamination: sub-visible particles; 2.9.53 Particulate contamination: sub-visible particles in non-injectable liquid preparation. European Pharmacopoeia 11.8.

<1788> Methods for the determination of subvisible particulate matter. United States Pharmacopoeia USP–NF/PF; 2024.

<430> Particle size analysis by dynamic light scattering. United States Pharmacopoeia USP–NF/PF; 2024.

¹⁸ ОФС.1.4.2.0006 Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2025.

¹⁹ ОФС.1.2.1.0009 Оптическая микроскопия. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

²⁰ <1788.2> Membrane microscope method for the determination of subvisible particulate matter. United States Pharmacopoeia USP–NF/PF; 2024.

²¹ 5.7.1 Subvisible particles. International Pharmacopoeia. 12th ed. 2025.

для получения качественного изображения. Проблемы возникают при оценке частиц неправильной формы или частиц с размерами, граничащими с диапазоном определения (например, размер частиц 9 или 11 мкм)²².

Методы СФМ и ММ используются в рутинном контроле лекарственных препаратов, нормативные требования гармонизированы в ведущих фармакопеях, в том числе и в фармакопее Российской Федерации, и обусловлены как спецификой конкретного метода, так и фасовкой препарата. Содержание посторонних невидимых частиц размером 10 мкм и более и частиц размером 25 мкм и более в препаратах с максимальным номинальным объемом 100 мл в одном контейнере при использовании метода ЛД не должно превышать 6000 и 600 соответственно, при использовании метода ММ — 300 и 3000 соответственно.

Для препаратов с номинальным объемом более 100 мл результаты по содержанию частиц не менее 10 мкм и не менее 25 мкм приводятся не на контейнер, а на 1 мл, для метода ЛД содержание частиц минимального нормируемого размера не должно превышать 25 частиц и для максимального — 3 частицы, для метода ММ — 12 и 2 частицы соответственно.

Из микроскопических методов наиболее перспективным считается микроскопический метод с визуализацией потока, который дает возможность не только подсчитать количество невидимых частиц, но и оценить их морфологию. Микроскопия с визуализацией потока — быстрый автоматизированный метод, который позволяет получить изображение (размер, количество, форма) микроскопических частиц в жидкости, проходящей через проточную ячейку²³. Метод широко используется для определения характеристик и подсчета твердых частиц, рекомендован для анализа прозрачных частиц, которые сложно обнаружить с помощью иных методов, позволяет оценить распределение частиц по размерам и их концентрацию [12]. Кроме того, частицы можно группировать по морфологии, зафиксировать в определенном диапазоне

размеров изображения всех частиц и архивировать полученное изображение.

Этот способ также дает возможность исследовать загрязнение образца посторонними частицами²⁴. Визуализация потока в диапазоне частиц размером 2–100 мкм позволяет различать удлиненные волокна, плотные симметричные пузырьки воздуха, круглые капли силиконового масла, аморфные белковые частицы и часто используется как дополнение к методам СФМ и мембранного микроскопа (ММ)²⁵.

Метод ММ с визуализацией потока активно применяется для анализа белковых частиц, в том числе для определения частиц, полученных из терапевтических моноклональных антител [13]. Преимущество вышеописанного способа — это селективность, повторяемость, высокое разрешение; ограничения связаны с трудностью визуализации частиц с невысокой оптической контрастностью, зависимостью результатов от алгоритма, используемого для отбора классификации частиц, испытуемый образец невозможно использовать повторно²⁶.

Метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)²⁷ в основном используется при технологических разработках в производстве лекарственных препаратов (ЛП), в том числе для получения информации о частицах нежелательного источника контаминации лекарственного средства.

Методы ММ с визуализацией потока и СЭМ не используются для рутинного контроля лекарственных средств, а являются дополнительными инструментами для определения особенностей гранулометрического состава и выявления нежелательной контаминации посторонними частицами как лекарственных препаратов, так и ингредиентов, входящих в состав конкретного ЛП.

ВЫВОДЫ

Все рассмотренные методы определения размеров и распределения невидимых частиц применяются в фармацевтической практике для оценки качества лекарственных средств. Выбор метода зависит от задачи и объекта

²² <1788.2> Membrane microscope method for the determination of subvisible particulate matter. United States Pharmacopeia USP–NF/PF; 2024.

²³ <https://www.fluidimaging.com/blog/what-is-flow-imaging-microscopy>

²⁴ Schwandt CS, Koten M, Stoeffler S. Flow imaging microscopy: A new analytical capability. <https://www.mccrone.com/mm/flow-imaging-microscopy-a-new-analytical-capability>

²⁵ <1788.3> Flow imaging method for the determination of subvisible particulate matter. United States Pharmacopeia USP–NF/PF; 2024.

²⁶ <1787> Measurement of subvisible particulate matter in therapeutic protein injections. United States Pharmacopeia USP–NF/PF; 2024.

²⁷ ОФС.1.2.1.001 Сканирующая электронная микроскопия. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

исследования. Для выявления невидимых посторонних частиц в лекарственных препаратах в соответствии с нормативными требованиями преимущественно используются методы светоблокировки и микроскопический, основанный на пропускании испытуемого образца через мембранные фильтры. Для определения фракционного состава в виде распределения частиц по размерам практикуются методы светоблокировки и динамического рассеивания света. При применении каждого из перечисленных методов следует учитывать тип и размер частиц, технологию лекарственного средства, физико-химические свойства испытуемого образца, скорость анализа, требования к точности метода, наличие оборудования и программного обеспечения, компетенцию персонала. В ряде случаев требуется комбинирование разных

методов для получения наиболее достоверных результатов или применение наиболее универсальных способов, в частности микроскопического метода с визуализацией потока, которые позволят определить размер, форму, природу невидимых частиц и содержание частиц конкретного размера в общем количестве.

Использование рассмотренных методов в соответствии с фармакопейными требованиями и рекомендациями как каждого отдельно, так и в комплексе, позволят достоверно и качественно оценить лекарственное средство, конкретную лекарственную форму по содержанию невидимых частиц при исследовании предельного их содержания и распределения по размерам для получения продукта высокого качества и безопасного при медицинском применении.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Новик ЕС, Доренская АВ, Борисова НА, Гунар ОВ. Методы оценки размера частиц в фармацевтической отрасли. Фармация. 2017;66(3):8–11. Novik ES, Dorenskaya AV, Borisova NA, Gunar OV. Particle size estimation techniques in the pharmaceutical industry. *Pharmacy*. 2017;66(3):8–11 (In Russ.). EDN: [YNFTAD](#)
2. Доренская АВ, Гунар ОВ. Влияние механических включений, обнаруженных в парентеральных препаратах, на здоровье пациентов. Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. 2014;9(4):36–41. Dorenskaya AV, Gunar OV. The influence of particulate matters, detected in parenterals on patients health. *Life without danger. Health. Prevention. Longevity*. 2014;9(4):36–41 (In Russ.). EDN: [TOMMRP](#)
3. Гунар ОВ, Доренская АВ, Сахно НГ. Механические включения в офтальмологических лекарственных препаратах. Химико-фармацевтический журнал. 2023;57(12):55–8. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2023-57-12-55-58> Gunar OV, Dorenskaya AV, Sakhno NG. Mechanical inclusions in ophthalmic drugs. *Pharm Chem J*. 2023;57(12):2009–12. <https://doi.org/10.1007/s11094-024-03109-x>
4. Fukuda M, Nagae S, Takarada T, Noda S, Morita SY, Tanaka M. Potential risk factors of protein aggregation in syringe handling during antibody drug dilution for intravenous administration. *J Pharm Sci*. 2025;114(3):1625–38. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2024.12.029>
5. Cho KO, Jeong EJ, Jeong SH, Kim KT, Kim KJ, Kim NA. Causes and analytical methods for subvisible particles formed in post-marketing biopharmaceutical products. *Yakhak Hoeji*. 2024;68(6):399–408. <https://doi.org/10.17480/psk.2024.68.6.399>
6. Liu F, Hutchinson R. Visible particles in parenteral drug products: A review of current safety assessment practice. *Curr Res Toxicol*. 2024;7:100175. <https://doi.org/10.1016/j.crttox.2024.100175>
7. Merkus HG. Laser diffraction. In: Merkus HG. *Particle size measurements: Fundamentals, practice, quality*. Springer Science & Business Media; 2009. P. 259–85. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9016-5_10
8. Li H, Li J, Bodycomb J, Patience GS. Experimental methods in chemical engineering: Particle size distribution by laser diffraction – PSD. *Can J Chem Eng*. 2019;97(7):1974–81. <https://doi.org/10.1002/cjce.23480>
9. Kulkarni VS, Shaw C. Particle size analysis: An overview of commonly applied methods for drug materials and products. In: Xu R. *Particle characterization: Light scattering methods*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801024-2.00008-X>
10. Ripple DC, Carrier MJ, Wayment JR. Standards for the optical detection of protein particles. *Am Pharm Rev*. 2011;14(5).
11. Воропаев АА, Фадейкина ОВ, Давыдов ДС, Мовсесянц АА. Использование малых объемов аналитических проб при определении невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2022;22(1):94–104. Voropaev AA, Fadeikina OV, Davydov DS, Movsesyants AA. The use of small volumes of test samples in subvisible particle testing by the light obscuration method. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):94–104 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-94-104>
12. Siddiqui A, Al Shareef AJ, Muzahem S, Jagadeesan P. Screening for subvisible particles in pharmaceutical formulations – a case study. *ScienceOpen Preprints*. 2023. <https://doi.org/10.14293/PR2199.000534.v1>
13. Zölls S, Weinbuch D, Wiggenhorn M, Winter G, Friess W, Jiskoot W, Hawe A. Flow imaging microscopy for protein particle analysis – a comparative evaluation of four different analytical instruments. *AAPS J*. 2013;15(4):1200–11. <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9522-2>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: С.И. Кулешова – концепция, сбор данных, написание текста и критический пересмотр его содержания; М.Л. Горюнова – сбор данных, анализ данных, подготовка текста рукописи; О.Н. Высочанская – сбор данных, анализ 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. *Svetlana I. Kuleshova* conceptualised, collected data, drafted for manuscript and critical review of its content. *Maria L. Goryunova* collected and analysed data, drafted for manuscript. *Olga N. Vysochanskaya* collected and analysed data, drafted for manuscript.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

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

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

Горюнова Мария Львовна / *Maria L. Goryunova*

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-5349-5543>

Высочанская Ольга Николаевна / *Olga N. Vysochanskaya*

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4327-6640>

Поступила 23.04.2025

После доработки 06.06.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Received 23 April 2025

Revised 6 June 2025

Accepted 6 June 2025



О.А. Ваганова ✉ 
Р.С. Смирнов 
С.А. Ленин 
К.С. Фунташев 
А.А. Костромских 
А.С. Перегудова 
Д.А. Кадыкова 
В.А. Меркулов 

Моноклональные антитела: разработка платформенных методик оценки примесей высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений

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

✉ Ваганова Ольга Александровна; vaganova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Разработка унифицированных методик контроля качества лекарственных средств на основе моноклональных антител (МАТ) является одной из задач стандартизации МАТ.

ЦЕЛЬ. Разработка и анализ возможности применения платформенных (универсальных) методик для оценки содержания примесей высокомолекулярных соединений и фрагментов, негликозилированных молекул в различных МАТ методами эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Лекарственные препараты, содержащие МАТ, 28 различных международных непатентованных наименований российского и иностранного производства. Исследования методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЭХ) проводили на приборах Agilent Technologies серии 1200, оснащенных детекторами поглощения в УФ-области. Обработку и анализ хроматограмм осуществляли с помощью программного обеспечения OpenLab. Капиллярный гель-электрофорез (КГЭ) проводили в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с использованием системы PA 800 plus (Beckman Coulter), оснащенной диодно-матричным детектором с поглощением в УФ-области и программным обеспечением Beckman 32Karat.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Подобраны универсальные условия пробоподготовки, хроматографического и электрофоретического разделения и определения содержания целевых соединений в препаратах МАТ, методики апробированы на 28 МАТ. Для каждого МАТ определены времена удерживания и времена миграции пиков целевых соединений. Проведено сравнение данных, полученных по разработанным методикам и по оригинальным методикам производителей МАТ. Проведена валидация методик определения содержания в образцах МАТ высокомолекулярных соединений методом ЭХ, фрагментов МАТ и негликозилированных молекул тяжелых цепей МАТ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях методом КГЭ. Правильность, воспроизводимость и чувствительность методик соответствуют установленным требованиям. Полученные результаты оценки валидационных характеристик методики ЭХ: прецизионность (*RSD*) площадей пиков составила для мономера не более 0,4%, для групп агрегатов до 8%, для общей площади пиков не более 0,4%, для относительной площади пика, соответствующего мономеру, – 0,02%. Линейность методики подтверждена в диапазоне концентраций 0,5–120%, правильность – в линейном диапазоне 99,1–102,1%, предел количественного определения (ПКО) – 0,1%. Валидационные характеристики методики КГЭ: прецизионность не более 1% для содержания основного пика иммуноглобулина или суммы пиков тяжелых и легких цепей и не более 1% для абсолютных времен миграции основных пиков. Линейность методик подтверждена в диапазоне концентраций от ПКО до 300%. Правильность для обеих методик составила 97,6–103,7%, ПКО – 0,5 и 0,75% соответственно.

ВЫВОДЫ. Разработанные методики оценки чистоты препаратов МАТ являются универсальными для неконъюгированных МАТ; по валидационным характеристикам специфичности, прецизионности, предела количественного определения, аналитической области, линейности, правильности соответствуют установленным критериям приемлемости и могут применяться на любом этапе жизненного цикла препаратов указанной группы.

Ключевые слова: моноклональное антитело; капиллярный электрофорез; эксклюзионная хроматография; качество лекарственных средств; нормативный документ; высокоэффективная жидкостная хроматография; платформенная методика; универсальная методика; валидация; чистота

Для цитирования: Ваганова О.А., Смирнов Р.С., Ленин С.А., Фунташев К.С., Костромских А.А., Перегудова А.С., Кадыкова Д.А., Меркулов В.А. Моноклональные антитела: разработка платформенных методик оценки примесей высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(3):330–346. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200093-9).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Olga A. Vaganova ✉ 
Roman S. Smirnov 
Sergei A. Lenin 
Kirill S. Funtashev 
Anastasia A. Kostromskih 
Alexandra S. Peregudova 
Darya A. Kadykova 
Vadim A. Merkulov 

Monoclonal Antibodies: Development of Universal (Platform) Methods for the Assessment of High and Low-molecular Weight Impurities

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

✉ Olga A. Vaganova; vaganova@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The development of unified techniques for quality control monoclonal antibodies (mAb) is one of the challenges for mAbs quality standardization.

AIM. This study aimed to develop and analyse the possibility of using platform (universal) techniques for estimating the impurity content of high molecular weight compounds and fragments, non-glycosylated molecules in various mAbs by methods of size-exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC) and capillary electrophoresis methods.

MATERIALS AND METHODS. MAbs-containing medicinal products from 28 different international nonproprietary names of Russian and foreign origin. Studies by SE-HPLC were carried out on Agilent Technologies 1200 series instruments equipped with UV detectors, with data processed via OpenLab software. Capillary gel electrophoresis (CGE) was conducted under both reducing and non-reducing conditions using a PA 800 plus system (Beckman Coulter) with UV diode array detection, and Beckman 32Karat software.

RESULTS. Universal sample preparation protocols and separation conditions were established and validated across 28 mAbs. Retention times and relative migration times of target compounds peaks were determined for each mAb. Comparative analysis demonstrated concordance between platform methods and manufacturers' proprietary methods. Validation of methods for determination of the content of high-molecular weight compounds in mAbs samples by the SE-HPLC method, fragments of mAbs and non-glycosylated variants of heavy chains of mAbs under reducing and non-reducing conditions by the CGE method was performed. The accuracy, precision, and sensitivity of the methods met the established requirements. The validation characteristics obtained for the SE-HPLC method were as follows: precision (RSD) of peak areas was no more than 0.4% for the monomer, up to 8% for aggregate groups, no more than 0.4% for total peak areas, and 0.02% for the relative peak area corresponding to the monomer. The method's linearity was confirmed within the concentration range of 0.5–120%, accuracy within 99.1–102.1%, and the limit of

quantification (LOQ) was 0.1%. For the CGE method, the validation characteristics showed precision of no more than 1% for intact immunoglobulin content or heavy and light chain peaks, and no more than 1% for absolute migration times of main peaks. Linearity was confirmed from LOQ to 300% concentration range. The accuracy for both methods ranged from 97.6–103.7%, with LOQ values of 0.5% and 0.75%, respectively.

CONCLUSIONS. The developed methods for assessing the purity are universal for unconjugated mAbs products. Their validation characteristics — including specificity, precision, limit of quantification, analytical range, linearity, and accuracy — meet all established acceptance criteria. These methods can be reliably implemented at any stage of the product lifecycle for this category of medicinal products.

Keywords: monoclonal antibody; mAb; capillary electrophoresis; size exclusion chromatography; quality of medicines; normative document; high performance liquid chromatography; platform technique; universal technique

For citation: Vaganova O.A., Smirnov R.S., Lenin S.A., Funtashev K.S., Kostromskih A.A., Peregudova A.S., Kadykova D.A., Merkulov V.A. Monoclonal antibodies: Development of universal (platform) methods for the assessment of high and low-molecular weight impurities. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(3):330–346. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346>

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. 124022200093-9).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Рынок биотехнологических препаратов в целом и моноклональных антител (МАТ) в частности бурно развивается [1]. С первыми лекарственными препаратами данной группы, зарегистрированными на рынках США и ЕС в конце 90-х гг. XX века, в настоящее время конкурируют препараты из европейских стран, Республики Корея, Китая, Индии, Ирана [2]. Наряду с регулярным появлением новых, оригинальных МАТ постоянно увеличивается доля биоаналогичных лекарственных препаратов.

В части контроля качества препаратов и разработки методик испытаний данной группы лекарственных средств (ЛС) также имеются приоритеты развития. Один из них — унификация применяемых методик испытаний и переход производителей на использование платформенных подходов (универсальных методик испытаний), применяемых для лекарственных средств различных составов, содержащих МАТ различных международных непатентованных наименований (МНН), производимых одной компанией как на одной, так и на разных производственных площадках.

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (ЭХ) — основной метод мониторинга высокомолекулярных соединений (ВМС), таких как димеры и олигомеры, используемый как на стадии разработки, так и для рутинного

контроля качества МАТ. Оценка содержания родственных и производственных примесей (в том числе нежелательных молекулярных вариантов) основывается на разнице их гидродинамических радиусов. Преимущество метода: минимальное влияние на конформацию белка и его структуру, возможность разделения компонентов с различной молекулярной массой (ММ) (например, мономер с ММ ~150 кДа и ВМС с ММ ≥300 кДа).

В качестве подвижных фаз в ЭХ применяют натриевые или калиевые фосфатные буферы, в качестве неподвижной фазы колонок — гидрофильный силикагель, оптимальный размер пор хроматографической колонки составляет 200–300 Å, что позволяет определять примеси размером до 500 кДа [3]. Детектирование проводится чаще при длине волны 280 нм, иногда при 214 нм¹ [4]. Перспективным направлением совершенствования данных методик является переход к методам ультраэффективной ВЭЖХ и подбор хроматографических колонок, неподвижная фаза которых не проявляет неспецифическую сорбцию определяемых соединений² [4].

Метод капиллярного гель-электрофореза (КГЭ) широко используется для анализа чистоты нативных белков (мономеров) (в невозстанавливающих условиях, НВУ) и определения суммарного содержания легких и тяжелых цепей (в восстанавливающих условиях, ВУ), низкомолекулярных

¹ Koza SM., Yang H., Yu YQ. Expanding size-exclusion chromatography platform method versatility for monoclonal antibody analysis using Waters XBridge Premier Protein SEC Columns. *Waters*. 2023;720007500.

² Там же.

примесей (фрагментов), а также неполностью сформировавшихся МАТ – негликозилированных молекул, тяжелых и легких цепей антител и их комбинаций³ [5]. В качестве фонового электролита используется гель, содержащий додецилсульфат натрия (ДСН). Коммерческие гелевые матрицы, имеющие также в своем составе линейные или слабо разветвленные полимеры (линейный полиакриламид, полиэтиленоксид, полиэтиленгликоль, декстран и пуллулан), позволяют разделять белковые молекулы в диапазоне ММ 10–225 кДа. Использование готовых коммерческих гелей в качестве разделяющего буфера позволяет резко повысить воспроизводимость и правильность получаемых результатов [6, 7].

Пробоподготовка анализируемых образцов при использовании метода КГЭ включает стадию нагревания в присутствии ДСН в высокой концентрации, что приводит к денатурации вторичных и третичных структур белка, в результате чего молекулы белка становятся равномерно заряженными. Метод определения основан на разделении, идентификации и определении содержания образующихся в результате денатурации комплексов «ДСН–белок» в кварцевом капилляре под действием приложенного высокого напряжения. Возникающее при этом у комплексов «ДСН–белок» постоянное отношение заряда к массе позволяет проводить их разделение по молекулярной массе, что обусловлено различием скорости миграции комплексов через матрицу геля, выступающей в качестве молекулярного сита, за счет различия их гидродинамических радиусов.

В НВУ денатурацию анализируемых белков проводят в присутствии алкилирующих реагентов (йодацетамид, N-этилmaleимид), блокирующих свободные сульфгидрильные группы; в ВУ – в присутствии 2-меркаптоэтанола или дитиотреитола, восстанавливающих дисульфидные связи белка до гликозилированной и негликозилированной тяжелых цепей и легкой цепи. Анализ МАТ в ВУ позволяет оценить степень гликозилирования тяжелых цепей и применяется для оценки количественного содержания негликозилированной тяжелой цепи. Для целей оценки деградации/стабильности продукта

более информативным является определение в НВУ, поскольку в этом случае удается оценить собственную фрагментацию образца (в ВУ часть фрагментов может образоваться в ходе реакции восстановления МАТ и разрыва цепей) [8]. Оценка чистоты МАТ методом КГЭ охватывает все перечисленные группы примесей и проводится в условиях как ВУ, так и НВУ [9].

Как правило, в КГЭ используется детектирование в УФ-области спектра, а также флуориметрическое детектирование. Методики с флуориметрическим детектированием имеют значимое (100-кратное) преимущество по чувствительности определения по сравнению с УФ-детектированием, но при этом требуют более сложной пробоподготовки, предусматривающей использование дорогостоящих реактивов. Для рутинных методик определения чистоты и гетерогенности более предпочтительным является УФ-детектирование. КГЭ с флуориметрическим детектированием может быть применен не только для определения чистоты белка, но и, поскольку является более чувствительным, в качестве дополнительного метода обнаружения примесей клеток-хозяев – для обнаружения минорных количеств посторонних белковых частиц [10].

Создание унифицированных методик для МАТ является задачей, решаемой по всему миру. Так, в США в настоящее время действует монография Фармакопеи США (USP)⁴, содержащая платформенную методику определения примесей высокомолекулярных соединений (ВМС) в МАТ методом высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. В качестве подвижной фазы используется буферный раствор, содержащий хлорид и фосфат калия с рН 6,2. В монографиях Европейской фармакопеи (Ph. Eur.) на голимумаб⁵ и инфликсимаб⁶, а также в проектах на готовую лекарственную форму голимумаба⁷, активную фармацевтическую субстанцию (АФС)⁸ и ЛП⁹ устекинумаба в качестве подвижных фаз указаны буферные растворы, содержащие фосфат натрия в различных концентрациях без/с добавкой натрия хлорида. Для анализа всех упомянутых МАТ используется одна и та же неподвижная фаза

³ Felten C., Solano O.S. Capillary electrophoresis in quality control: Part I: Application for therapeutic proteins. *SCIEX*. 2018.

⁴ <129> Analytical procedures for recombinant therapeutic monoclonal antibodies. <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/biologics/guide-proc-for-recombinant-therapeutic.pdf>

⁵ 01/2025:3103 Golimumab concentrated solution. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2025.

⁶ 04/2023:2928 Infliximab concentrated solution European Pharmacopoeia 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2023.

⁷ PA/PH/Exp. P4Bio/T (21) 17 ANP. XXXX:3187 Golimumab injection. Ph. Eur. 36.3; 2024.

⁸ PA/PH/Exp. P4Bio/T (21) 17 ANP. XXXX:3165 Ustekinumab concentrated solution. Ph. Eur. 36.3; 2024.

⁹ PA/PH/Exp. P4Bio/T (21) 17 ANP. XXXX:3188 Ustekinumab injection. Ph. Eur. 36.3; 2024.

(хроматографические колонки (размер зерна 5 мкм, 7,8×300 мм) с гидрофильным силикагелем в качестве сорбента). Для анализа лекарственной формы голиумаба (по сравнению с АФС голиумаба) в дополнение к хроматографической колонке используется предколонка 5 мкм, 0,4×6 мм. Скорости потоков составляют 0,5 мл/мин (USP¹⁰) и 1,0 мл/мин (все монографии Ph. Eur.). Детектирование осуществляется либо при одной длине волны – 280 нм, либо одновременно на двух длинах волн – 214 и 280 нм.

Задача работы – разработка и валидация методик, предназначенных для испытания ЛС, содержащих МАТ, по показателю «Чистота». Новизна предлагаемого решения авторов заключается в оптимизации условий определения, позволяющих оценивать чистоту любых МАТ двумя ортогональными методами. Испытание по универсальным (платформенным) методикам было проведено для максимально широкого перечня МАТ различных МНН, произведенных как отечественными, так и зарубежными производителями, для 28 МАТ по методике ЭХ ВЭЖХ и 18 МАТ по методике КГЭ.

Цель работы – разработка и анализ возможности применения универсальных (платформенных) методик для оценки содержания примесей высокомолекулярных соединений, фрагментов, негликозилированных молекул в различных моноклональных антителах методами эксклюзионной хроматографии и капиллярного электрофореза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В качестве исследуемых образцов использовали лекарственные препараты отечественного и зарубежного производства, соответствующие следующим МНН: пембролизумаб, бевацизумаб, ритуксимаб, тоцилизумаб, ниволумаб, вендолизумаб, секукинумаб, ранибизумаб, экулизумаб, даратумумаб, пертузумаб, динутуксимаб бета, устекинумаб, цетуксимаб, дупилумаб, олокизумаб, нетакимаб, равулизумаб, сарилумаб, элотузумаб, леканемаб, безлтоксумаб, инфликсимаб, полатузумаб ведотин, атезолизумаб, иксекизумаб, рисанкизумаб, сенипрутут.

Для приготовления подвижных фаз при проведении хроматографических исследований использовали: гидрофосфат калия (кат. № 029619, Central Drug House Ltd.); дигидрофосфат калия (кат. № 60220, Sigma-Aldrich); хлорид калия (кат.

№ 1.04933.0500, Merck). Для коррекции pH применяли концентрированную фосфорную кислоту (кат. № 345245, Sigma-Aldrich). Для проведения электрофореза использовали SDS-гель буферный раствор и SDS-MW буферный раствор для образцов (кат. № 390953, AB Sciex), йодацетамид (кат. № RC-150, G-Biosciences), β-меркаптоэтанол (кат. № 1425ML100, neoFroxx), 0,1 М натрия гидроксид (кат. № 390953, AB Sciex); 0,1 М хлористоводородную кислоту (№ 390953, AB Sciex). Применяли следующие стандартные образцы (СО): внутренний СО – 10 кДа, 5 мг/мл (кат. № 390953, AB Sciex); СО для гель-фильтрации: тиреоглобулин, бычий гамма-глобулин, куриный овальбумин, лошадиный миоглобин и витамин В₁₂ (кат. № 1511901, Bio-Rad); рабочие СО анализируемых МАТ (in-house СО).

Хроматографические колонки: TSKgel G3000swxl, 5 мкм, 7,8×300 мм (PN:0008541, SN: 0156A068346, LN: 015GA, Tosoh); Phenomenex BioSep SEC-s3000, 5 мкм, 7,8×300 мм (PN:00H-2146-KO, SN: H21-322431, LN: 6583-0331, Phenomenex).

Все подвижные фазы и растворы готовили с использованием воды высокоочищенной, полученной на установке Milli-Q Integral 15 (Millipore® Corp.), с последующей фильтрацией под вакуумом через одноразовые системы с мембранным фильтром из полиэфирсульфона с диаметром пор не более 0,2 мкм (кат. № EXVF1000YPS02CZS, GVS).

Оборудование. Использовали хроматографы Agilent Technologies серии 1200, оснащенные детекторами поглощения в УФ-области: диодно-матричными детекторами и детекторами с фиксированной длиной волны (VWD). Для обработки и анализа полученных хроматограмм применяли программное обеспечение OpenLab¹¹. Использовали систему капиллярного электрофореза PA 800 plus (Beckman Coulter), оснащенную диодно-матричным детектором с поглощением в УФ-области, при использовании апертуры 100×200 мкм (кат. № 144712, Beckman Coulter). Полученные электрофореграммы обрабатывали с помощью программного обеспечения Beckman 32Karat¹².

Пробоподготовка. Эксклюзионная хроматография. Образцы анализировали, используя хроматографические колонки для гель-фильтрации, обеспечивающие диапазон определения целевых

¹⁰ <129> Analytical procedures for recombinant therapeutic monoclonal antibodies. <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/biologics/guide-proc-for-recombinant-therapeutic.pdf>

¹¹ <https://www.agilent.com/en/product/software-informatics/analytical-software-suite/chromatography-data-systems/openlab-cds>

¹² <https://sciex.com>

молекулярных масс, характерных для димеров и агрегатов МАТ в диапазоне 10–500 кДа. Исследуемые образцы готовили восстановлением до концентраций 10 мг/мл с использованием подвижной фазы. СО, содержащий маркеры молекулярных масс, восстанавливали и далее разводили водой для хроматографии до концентрации 10 мг/мл.

Капиллярный гель-электрофорез в невосстанавливающих условиях. Исследуемые образцы разбавляли SDS-MW буферным раствором до расчетной концентрации целевого белка 1 мг/мл. К 95 мкл полученного раствора добавляли 2 мкл внутреннего СО 10 кДа, затем образцы обрабатывали 5 мкл раствора 250 мМ йодоацетамидом и нагревали в течение 3 мин при 70 °С. Охлаждали образцы в течение 3 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 300g в течение 1 мин.

Капиллярный гель-электрофорез в восстанавливающих условиях. Исследуемые образцы разбавляли SDS-MW буферным раствором до расчетной концентрации целевого белка 1 мг/мл. К 95 мкл полученного раствора добавляли 2 мкл внутреннего СО 10 кДа. Далее осуществляли восстановление дисульфидных связей образцов добавлением 5 мкл раствора β-меркаптоэтанола и нагреванием в течение 3 мин при 100 °С с последующим охлаждением и центрифугированием при 300g в течение 1 мин.

Валидацию методик проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ), Фармакопеи Евразийского экономического союза (ФЕАЭС)¹³ [11] по следующим критериям: специфичность, прецизионность, линейность, правильность, пределы определения и количественного определения, диапазона применимости и устойчивости (робастности) разработанных методик.

Статистическая обработка результатов. Проводили оценку площадей (или скорректированных площадей в случае метода КГЭ) целевых пиков, времени удерживания целевых пиков (хроматографические методы) и времени миграции (метод КГЭ), рассчитывали среднее арифметическое и относительное стандартное отклонение (RSD, %). Интервал значений относительных

величин представлял собой величину среднего арифметического значения с учетом отклонений на трехкратную величину стандартного отклонения (SD). Способы расчета и выбор представления значения характеристики и неопределенности соответствовал требованиям ГОСТ Р 8.694-2010¹⁴. Общие статистические принципы определения метрологических характеристик соответствовали требованиям ГФ РФ и Решения Коллегии ЕЭК¹⁵.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основное внимание при разработке методик уделялось их универсальности, то есть возможности определять целевые соединения в любых МАТ, относящихся к разным МНН и имеющим различное специфическое действие. Проводилась работа по допустимому «упрощению» методик в части применения коммерчески доступных и, по возможности, недорогих реактивов, материалов и СО. При этом «упрощение» не должно было приводить к потере специфичности методик и снижению таких аналитических характеристик, как правильность, чувствительность, специфичность.

На первом этапе оценивалась специфичность методики, на втором этапе была проведена количественная оценка по наиболее важным валидационным параметрам: специфичности, воспроизводимости и правильности. Полученный хроматографический профиль и данные по содержанию целевых компонентов (мономер и примесей ВМС), определенные по разработанной нами методике, сравнивали с результатами, полученными при анализе МАТ каждой из исследованных серий с использованием оригинальных методик (ретроспективные данные ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, полученные в результате уставной деятельности учреждения). В случае получения удовлетворительных результатов методики испытаний направлялись отечественным производителям МАТ на апробацию. При этом в ходе апробации в лабораториях отечественных производителей МАТ и при валидации методик авторами подтверждена их специфичность, воспроизводимость и правильность, гарантирующие соответствие методик заявленным целям, для всех испытанных МАТ.

¹³ ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023. ОФС 2.3.14.0 Валидация аналитических методик. Фармакопея Евразийского экономического союза Т. 1. Ч. 2. М.; 2023.

¹⁴ ГОСТ Р 8.694-2010 (Руководство ИСО 35:2006) Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы материалов (веществ). М.; 2012.

¹⁵ ОФС 1.1.0013 Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

Решение Коллегии ЕЭК от 04.10.2022 № 137 «О внесении изменений в Руководство по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».

После учета замечаний, полученных от производителей МАТ, проводилась валидация методик.

При разработке методик основывались на принципах, изложенных в ГФ РФ¹⁶ и в Решениях Коллегии ЕЭК¹⁷.

Платформенная методика определения содержания высокомолекулярных родственных примесей с использованием метода эксклюзионной хроматографии. При разработке методики определения примесей ВМС в качестве подвижной фазы использовали фосфатно-солевой буферный раствор с рН 6,2, содержащий 200 мМ фосфата калия, 250 мМ хлорида калия. В качестве аналитической была выбрана длина волны 280 нм, которая, имея несколько меньший (по сравнению с детектированием на длине волны 214 нм) отклик, тем не менее обладает большей специфичностью для определяемых соединений, обусловленной отсутствием вклада поглощения полисорбата, который практически всегда входит в состав рецептурного буфера АФС и ЛП терапевтических МАТ. Детектирование проводили в двух вариантах: на диодноматричном детекторе (DAD) и на более чувствительном детекторе с фиксированной длиной волны (VWD). Испытания на детекторе VWD проводились для оценки необходимости повышения чувствительности методики. В качестве неподвижной фазы апробированы 2 варианта хроматографических колонок: колонка TSKgel и колонка BioSep (табл. 1).

По итогам экспериментов была подтверждена специфичность колонки TSKgel по отношению к проанализированным МАТ. Также отмечено,

что на колонке TSKgel разделение целевых соединений происходит только по эксклюзионному механизму, то есть порядок выхода и относительные времена удерживания (RRT) всех элюируемых соединений (пиков) не меняются независимо от МАТ. Стандартное время удерживания мономера МАТ, имеющего молекулярную массу ~150 кДа, в выбранных условиях испытания составило 15–18 мин, высокомолекулярные примеси элюировались с относительным временем удерживания (RRT) 0,80–0,85 по отношению к пику мономера (рис. 1. Хроматограмма пемролизумаба. Опубликовано на сайте журнала (Приложение 1)¹⁸).

При испытании на колонке BioSep были выявлены неспецифические сорбционные взаимодействия анализируемых белков и сорбента: порядок элюирования пиков менялся, RRT имел нехарактерные значения. Так, например, мономер пембролизумаба и его высокомолекулярные примеси дополнительно удерживаются по обращенно-фазовому механизму, что следует из изменения времени удерживания и изменения порядка выхода пиков. Время удерживания мономера составляет от 24,5 до 25,5 мин, пики примесей ВМС имеют измененный порядок выхода (пик агрегата 1 и агрегата 2 меняются местами) (рис. 2. Хроматограмма пемролизумаба. Опубликовано на сайте журнала (Приложение 1)¹⁹). При использовании колонки BioSep подвижную фазу потребовалось бы корректировать введением какого-либо органического модификатора, в связи с этим от дальнейшего использования колонки BioSep при разработке платформенной методики отказались.

Таблица 1. Технические характеристики хроматографических колонок

Table 1. Comparative analysis of the technical parameters of TSKgel columns

Параметры	Характеристики	
	Tosoh 0008541 TSKgel® G3000SWXL	Phenomenex BioSep-SEC-s3000
Скорость потока / предельное давление	0,5–1,0 мл/мин (≤ 72 бар)	≤1500 psi (~100 бар)
Рабочий диапазон рН	2,5–7,5	2,5–7,5
Максимальная температура	10–30 °С	50 °С
Диапазон эксклюзии (глобулярные белки)	до 500000 Да	5000–700000 Да
Размер пор	25 нм	29 нм

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

¹⁶ ОФС.1.2.1.2.0001 Хроматография; ОФС.1.2.1.0022.15 Капиллярный электрофорез; ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

¹⁷ Решения Коллегии ЕЭК от 07.09.2018 № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата»; от 04.10.2022 № 137 «О внесении изменений в Руководство по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».

¹⁸ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex1>

¹⁹ Там же.

Хроматографические профили, а также содержания компонентов препаратов, определенные с использованием колонки TSKgel по платформенной методике и оригинальным методикам, используемым для контроля качества препаратов, сопоставимы (табл. 2; рис. 3. Хроматограмма олокизумаба. Сопоставление профилей МАВ, полученных по платформенной и оригинальной методикам; рис. 4. Хроматограмма даратумумаба. Сопоставление профилей МАТ, полученных по платформенной и оригинальной методикам, Опубликовано на сайте журнала (Приложение 1)²⁰). В оригинальных методиках используются колонки TSKgel BioAssist G3SW_{XL} биоинертная версия G3000SWXL, а также колонка, аналогичная предложенной в платформах, TSKgel G3000SWXL 300×7,8, 5 мм, которые позволяют корректно разделять высокомолекулярные соединения и мономер.

Чистота объектов, определенная двумя способами, коррелирует (принимая во внимание то, что в исследовании использованы образцы с уже истекшим сроком годности, что обусловило увеличение примесей ВМС на момент испытаний по разрабатываемой методике) (табл. 2). В таблицу не включены данные по содержанию низкомолекулярных примесей (НМС),

поскольку данную методику не рекомендуется использовать для оценки этой группы примесей без дополнительной верификации или валидации для конкретного объекта испытаний. Содержание примесей ВМС и мономера рассчитывали методом внутренней нормализации площадей в процентах от общей площади всех пиков белковой природы на хроматограмме (включая пики НМС). Интегрирование пика мономера выполняли по наиболее строгому варианту с разметкой не полностью разделенных пиков и «плечевых» пиков примесей НМС путем опускания перпендикуляра к общей базовой линии. Таким образом, при расчетах учитывался вклад примесей НМС в общую площадь интегрируемых пиков. Правильность определения НМС как таковых недостаточна, но в силу их относительно малого содержания (в сравнении с мономером и общей площадью пиков) погрешность оценки содержания мономера при таком подходе минимальна.

Стандартные образцы. В качестве СО использовали два типа образцов: СО, содержащий маркеры молекулярной массы, и СО предприятия, аттестованный в установленном порядке, содержащий анализируемый МАТ. Оба типа СО использовались только для проверки пригодности

Таблица 2. Оценка содержания мономера и высокомолекулярных соединений (оцененные методом внутренней нормализации) в моноклональных антителах (МАТ)

Table 2. Results of a comparative assessment of the content of monomer and high-molecular compounds (estimated by the internal normalization method), in% for some of the studied MABs

Международное непатентованное наименование МАТ	Срок годности испытуемых МАТ	Результаты, полученные по платформенной методике		Результаты, полученные по оригинальной методике	
		Мономер, %	ВМС, %	Мономер, %	ВМС, %
Ниволумаб	2021 г.	99,1	0,8	99,0	0,7
Экулизумаб № 1	2021 г.	98,8	1,0	99,5	0,5
Экулизумаб № 2	2021 г.	99,4	0,4	99,5	0,3
Олокизумаб	2021 г.	98,9	1,0	99,2	0,8
Даратумумаб	2021 г.	98,0	1,6	98,4	1,4
Пембролизумаб	2023 г.	98,9	1,1	99,8	0,2
Данатуксимаб	2023 г.	99,6	0,3	99,7	0,1
Устекинумаб	2020 г.	98,5	0,3	99,1	0,7
Цетуксимаб	2018 г.	99,2	0,3	99,4	0,3
Тоцилизумаб	2023 г.	99,4	0,5	99,5	0,4
Дупилумаб	2020 г.	97,2	2,0	98,5	1,5
Пертузумаб+Трастузумаб	2021 г.	98,7	0,5	99,6	0,3

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

Примечание. ВМС – высокомолекулярные соединения, МАТ – моноклональные антитела для медицинского применения.

²⁰ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex1>

хроматографической системы. В качестве СО с маркерами молекулярной массы использовали набор, содержащий 5 маркеров ВМС (тиреоглобулин, бычий гамма-глобулин, куриный овальбумин, лошадиный миоглобин (белки с ММ 17000–670000 Да) и НМС витамин В₁₂ (ММ 1350 Да)). Может быть использован иной набор аналогичных по качеству СО (маркеров) молекулярной массы, состав которого может быть сокращен, но должен включать один маркер НМС, элюирующегося с общим свободным объемом колонки, и как минимум два белка-маркера с молекулярными массами 50000–600000 Да, отличающимися друг от друга не менее чем в 2 и не более чем в 4 раза.

Оценка пригодности хроматографической системы. Оценка пригодности хроматографической колонки проводили по хроматограмме СО смеси белков-маркеров и НМС; оценку разделительной способности хроматографической системы – с использованием СО маркеров молекулярных масс и СО испытуемого МАТ, обогащенного примесями ВМС. Обогащенный примесями ВМС образец получали путем принудительной деградации СО МАТ в условиях: 1) УФ-облучение при длине волны 254 нм в течение 1 ч с размещением источника облучения на расстоянии 10 см от образца; 2) воздействие повышенной температуры 105 °С в течение 4 ч; 3) воздействие повышенной температуры 60 °С в течение 30 мин. После проведения принудительной деградации количество примесей ВМС возрастало до 5, 15 и 1,7% соответственно.

Оценка пригодности хроматографической системы включала в себя проверку по критериям, требуемым ГФ РФ²¹.

Описание методики и условия проведения анализа. Описание приготовления растворов испытуемых и стандартных образцов, подвижной фазы, требования к пригодности хроматографической системы разработанной универсальной методики определения содержания высокомолекулярных примесей с использованием метода эксклюзионной ВЭЖХ представлены в Приложении 2 (опубликовано на сайте журнала²²). Раствор сравнения 1 включает маркеры молекулярных масс, раствор сравнения 2 включает стандартный образец анализируемого МАТ (in house).

Условия хроматографирования: колонка – 300×7,8 мм, гидрофильный силикагель для хро-

матографии (5 мкм), размер пор 25 нм, пригодный для разделения глобулярных белков в диапазоне молекулярных масс 10000–500000 Да (например, TSKgel G3000SWXL, 300×7,8 мм, 5 мкм, размер пор 25 нм, Tosoh Bioscience, кат. № 0008541); температура колонки – 23±2 °С; скорость потока – 0,5 мл/мин; детектор – УФ-детектор при 280 нм; температура автосэмплера – 2–8 °С; объем пробы – 20 мкл; нагрузка белка на колонку около 200 мкг; время хроматографирования – 30 мин.

Последовательность хроматографирования. Хроматографировали растворы в следующей последовательности, вводя пробы в количествах, кратных «n»: контрольный раствор (n=1), раствор плацебо (n=1), раствор сравнения 2 (n=2), раствор для оценки чувствительности хроматографической системы (n=1), раствор сравнения 1 (n=3), испытуемый раствор (n=2), раствор сравнения 1 (n=1). Оценка пригодности хроматографической колонки для целей методики и оценку эффективности колонки выполняли с использованием раствора СО маркеров. Оценка разделительной способности и воспроизводимости используемой хроматографической системы – с использованием раствора сравнения СО МАТ.

Обработка результатов и анализ данных. Определение содержания целевых соединений осуществлялось методом внутренней нормализации площадей. На хроматограммах испытуемого раствора и раствора СО МАТ идентифицировали пик мономера как пик самой большой площади, с временем удерживания меньшим, чем время удерживания пика низкомолекулярного маркера молекулярной массы на хроматограмме раствора сравнения 2 и пиков компонентов плацебо. Пики с меньшими временами удерживания, чем пик мономера, соответствовали пикам высокомолекулярных соединений, с большими – пикам низкомолекулярных соединений.

Интегрирование пиков соединений с временем удерживания меньшим, чем время удерживания низкомолекулярного маркера молекулярной массы на хроматограмме раствора сравнения 2, проводили в соответствии с ГФ РФ²³. В расчетах не учитывали пики, присутствующие на хроматограмме контрольного раствора, раствора плацебо, а также отдельно стоящие пики с площадью менее площади пика мономера

²¹ ОФС.1.2.1.2.0001 Хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

²² <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex2>

²³ ОФС.1.2.1.2.0005 Высокоэффективная жидкостная хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

на хроматограмме раствора для оценки чувствительности хроматографической системы.

Пики ВМС и НМС, имеющие общую базовую линию и отделенные друг от друга вертикальными линиями разметки, учитывали независимо от их содержания.

Валидацию методики определения содержания высокомолекулярных примесей методом эксклюзионной хроматографии проводили на препарате, содержащем пембролизумаб. В соответствии с требованиями ГФ РФ и ФЕАЭС²⁴ проводилась оценка специфичности, прецизионности, линейности, правильности, предела определения и предела количественного определения, диапазона применимости и устойчивости (робастности) разработанной методики.

Оценку *специфичности* проводили путем визуального сравнения хроматограмм испытуемых образцов и хроматографического профиля, получаемого для каждого из исследуемых МАТ по оригинальной методике производителей данных МАТ. Также для подтверждения отсутствия влияния вспомогательных веществ на профиль хроматограммы использовали растворы плацебо. В качестве раствора плацебо использовали рецептурный буферный раствор, содержащий все компоненты готового нерасфасованного продукта, активной фармацевтической субстанции или ЛП (кроме самого МАТ) и разведенный аналогично испытуемому раствору. Все получаемые хроматографические профили соответствовали профилям, полученным по оригинальным методикам. На хроматограммах растворов плацебо не было обнаружено аналитически значимых пиков в диапазонах времен удерживания пиков целевых соединений. Таким образом, специфичность методики была подтверждена.

Прецизионность. Оценка повторяемости проводилась путем расчета значения *RSD* относительных значений площадей целевых пиков, а также их времен удерживания. Статистическую обработку проводили по результатам измерения шести независимых проб одной серии препарата с индивидуальной пробоподготовкой в разные дни двумя аналитиками в одних условиях хроматографирования. Значение показателя *RSD* абсолютных площадей пиков при оценке сходимости работы аналитиков составило: для мономера – 0,37%, для группы агрегатов № 1 – 8%, группы агрегатов № 2 – 0,51%, для общей площади пиков, принимаемых в расчет, – 0,39%. Для относительной площади мономера *RSD*

составило 0,02%. Значение *RSD* абсолютных времен удерживания пиков составило: для мономера – 0,03%, для группы агрегатов № 1 – 1,73%, группы агрегатов № 2 – 0,06 %.

Прецизионность методики также оценивали по аналогичным критериям для СО белков-маркеров молекулярных масс.

Значение показателя *RSD* абсолютных площадей пиков при оценке сходимости работы аналитиков составило: для тиреоглобулина – 1,39%, гамма-глобулина – 4,24%, овальбумина – 7,1%, миоглобина – 0,84%, витамина В₁₂ – 1,10%, общей площади пиков – 2,04%. Для относительной площади пика витамина В₁₂ *RSD* составило 2,27%, для абсолютных времен удерживания пиков указанных соединений – 0,01–0,05%.

Линейность. Линейность методики определяли путем оценки коэффициента детерминации (*r*²) линейной регрессии зависимости отклика детектора (по пику мономера) от концентрации испытуемого раствора в диапазоне 0,5–20%. Для этого последовательно анализировали в одних хроматографических условиях растворы с концентрацией специфичного МАТ (мг/мл (%)): 0,005 (0,5); 0,01 (1); 0,025 (2,5); 0,05 (5); 0,075 (7,5); 0,25 (25); 0,5 (50); 0,8 (80); 1,0 (100); 1,2 (120). Экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием линейной модели. Отдельно оценивали диапазоны 0,5–7,5% (для оценки неспецифической сорбции белка в системе) и 80–120%. Значение *r*² площади пика мономера на участках как нижней, так и верхней границ диапазона составило 1,0000. Таким образом, линейность методики была подтверждена в диапазоне концентраций 0,5–120% от целевой концентрации испытуемых растворов, значительного влияния неспецифической сорбции белка в нижней части аналитического диапазона методики не выявлено.

Правильность методики оценивали с помощью данных, полученных при подтверждении линейности методики. Для этого вычисляли открываемость относительно теоретического значения для рассчитанной по уравнению линейной регрессии концентрации каждого проанализированного раствора. Значение открываемости составило: в диапазоне 0,5–7,5% – от 99,9 до 102,1%; в диапазоне 80–120% – от 99,05 до 99,22%. Таким образом, правильность методики была подтверждена.

Предел количественного определения методики был установлен на уровне 0,5% от целевой

²⁴ ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023. ОФС 2.3.14.0 Валидация аналитических методик. Фармакопея Евразийского экономического союза Т. 1. Ч. 2. М.; 2023.

концентрации белка, в соответствии с данными, полученными при подтверждении линейности и правильности методики.

Платформенная методика определения родственных примесей (фрагментов) методом капиллярного электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. При разработке методики КЭФ основывались на данных литературы [8, 12], а также на протоколе пробоподготовки руководства «Система фармацевтического анализа PA 800 plus SDS-MW метод разделения белков по размеру Beckman Coulter», США²⁵.

Пробоподготовка. Исследуемые образцы разбавляли SDS-MW буферным раствором для образцов до расчетной концентрации целевого белка 1 мг/мл, после чего к 95 мкл полученного раствора добавляли 2 мкл внутреннего СО 10 кДа. Далее в НВУ добавляли 5 мкл раствора для алкилирования и нагревали в течение 3 мин при 70 °С. В ВУ осуществляли восстановление дисульфидных связей МАТ путем добавления 5 мкл раствора β-меркаптоэтанола, после чего нагревали образцы в течение 3 мин при более высокой температуре (100 °С). По окончании нагревания все образцы охлаждали при комнатной температуре и центрифугировали при 300g.

Оригинальные методики также основаны на протоколах, сопровождающих аналитическое оборудование, но варьируются в части соотношений целевого белка и реактивов (растворы йодацетамида, 2-меркаптоэтанола), используемых в пробоподготовке, различного состава и значений pH буферных растворов, целевых концентраций белка (колеблются в интервале 1,0–2,5 мг/мл). Значительные отличия имеются в условиях проведения этапа термической обработки реакционной смеси. Применяются капилляры различной длины (общей и эффективной) от 50 до 67 см и от 10 до 20 см соответственно, разделение в диапазоне напряжений от 0 до +30 кВ (повышение напряжения от 0 кВ до 15,0 кВ за 1,0 мин), с величиной тока от 0 до 300 мкА, условий подготовки капилляра к разделению (промывка и кондиционирование) ввода и разделения образцов на приборе (настройки оборудования), времени электрофоретического разделения. Все вышеперечисленное оказывает прямое влияние на чувствительность и разделительную способность системы. Различным является подход к расчету и оценке результатов испытаний.

В изначально выбранных условиях испытания (величина тока менее 10 кВ и время разделения

30 мин) для нескольких МАТ в НВУ на электрофореграммах наблюдалась неполная картина разделения, часть пиков ВМС оказалась за пределами рабочего времени проведения электрофореза (более 30 мин) и они не отразились на электрофореграммах, что было неприемлемым. Для оптимизации разделения в ВУ и НВУ были подобраны следующие условия электрофоретического разделения.

Капилляр: кварцевый капилляр без покрытия Uncoated Capillary, внутренний диаметр 50 мкм, общая длина 30,2 см, эффективная длина 20 см (из набора SDS-MW Analysis Kit, кат. 338451, Beckman Coulter), апертура 100×200 мкм (кат. № 144712, Beckman Coulter).

Условия разделения: ввод пробы – электрокинетический, в течение 20 с при 5 кВ, полярность – обратная (ввод с длинного конца капилляра); параметры разделения – напряжение 15,0 кВ, давление 20 psi на оба конца капилляра, линейное повышение напряжения от 0 до 15,0 кВ за 1,0 мин, время разделения 40 мин. **Детектирование:** детектор – УФ-детектор, аналитическая длина волны – 220 нм, частота сбора данных – 2 Гц, ширина щели 10 нм. Температура капилляра – 25±2 °С. Температура автосэмплера – 25±2 °С. Смена растворов (цикл) – каждые 8 вводов.

Время разделения может изменяться в зависимости от анализируемого объекта, но должно составлять не менее 1,1 от времен миграции пика тяжелой цепи на электрофореграмме восстановленного раствора сравнения или 1,1 от времен миграции основного пика на электрофореграмме невосстановленного раствора сравнения.

Стандартные образцы. Использовали два типа стандартных образцов: внутренний СО и СО, содержащий определяемый МАТ. Внутренним СО, предназначенным для количественного определения целевых пиков, являлся маркер молекулярной массы – иммуноглобулин с ММ 10 кДа. Второй стандартный образец – СО предприятия (in-house), аттестованные в установленном порядке, содержащие МАТ, испытания которых проводились методом КГЭ. Для проверки пригодности электрофоретической системы использовался in-house СО МАТ.

Провести сравнительный анализ результатов, полученных по разным методикам, для всех исследованных в этой работе МАТ не представлялось возможным, поскольку для анализа некоторых из них в оригинальных методиках

²⁵ PA 800 plus Pharmaceutical analysis system. User manuals. Application guide. SDS-MW Analysis.

использован метод электрофореза в полиакриламидном геле, для некоторых метод интегрирования пиков и способ расчета содержания отличается от принятого в платформенной методике, для некоторых оценка фрагментов вообще не была предусмотрена на этапе выходного контроля МАТ и не была включена в нормативную документацию.

Немаловажным фактором при сравнении результатов, полученных методом КГЭ с использованием оригинальной и платформенной методик, является способ интегрирования пиков и способ расчета чистоты в МАТ. Оригинальные методики по-разному оценивают чистоту МАТ (содержание фрагментов): в одних случаях к основным пикам относят только пик интактного иммуноглобулина (НВУ) или пики легкой и тяжелой цепей (ВУ) (методики определения МАТ № 2–3). В других случаях с основными пиками суммируют пик негликозилированной тяжелой цепи, повышая таким образом относительную площадь на 2–5% (методики определения МАТ № 1), что приводит к завышению результатов (табл. 3).

Оценка пригодности электрофоретической системы. Проверку пригодности системы осуществляли с использованием СО испытуемого МАТ. Основными критериями пригодности системы являлись:

- выявление примесей в соответствии с заявленным пределом обнаружения методики и количественную оценку в соответствии

с заявленным пределом количественного определения (оценка чувствительности по значению отношения сигнал/шум);

- разделение примесей между собой и с пиками мономера/легкой/тяжелой цепей (требование к степени разрешения между пиками и числу теоретических тарелок);
- миграция пиков всех оцениваемых соединений от зоны ввода пробы к детектору (требование к времени миграции пика внутреннего СО (10 кДа));
- параметры пиков соединений позволяют оценивать их с приемлемой воспроизводимостью и правильностью (требования к относительному стандартному отклонению скорректированной площади пиков и времени их миграции, требование к значению симметрии пиков).

Описание методики и условия проведения анализа. Детальное описание приготовления растворов испытуемых и стандартных образцов в условиях НВУ и ВУ, программы предварительного кондиционирования капилляра, разделения, промывки капилляра после проведения анализа, требования к пригодности электрофоретической системы в условиях НВУ и ВУ, разработанной методики определения содержания низкомолекулярных примесей (фрагментов) и негликозилированных частей молекул с использованием КГЭ представлены в Приложении 2 (опубликовано на сайте журнала²⁶). В качестве рабочей была выбрана концентрация 1 мг/мл. Проверку разделительной способности электрофоретической системы в условиях НВУ

Таблица 3. Оценка чистоты препаратов моноклональных антител (МАТ), выполненная методом капиллярного электрофореза

Table 3. Results of comparative assessment of the purity of some studied MATs, determined under reducing and non-reducing conditions (assessed by the internal normalization method), %

Международное непатентованное наименование МАТ	Срок годности испытуемых МАТ	Результаты, полученные по платформенной методике		Результаты, полученные по оригинальным методикам производителей	
		Невосстанавливающие условия. Содержание интактного иммуноглобулина, %	Восстанавливающие условия. Суммарное содержание легкой и тяжелой цепей, %	Невосстанавливающие условия. Содержание интактного иммуноглобулина, %	Восстанавливающие условия. Суммарное содержание легкой и тяжелой цепей, %
Даратумумаб (МАТ № 1)	2019 г.	96,6	96,5	97,3	97,3
Дупилумаб № 1 (МАТ № 2)	2022 г.	93,7	95,1	94,5	96,9
Пембролизумаб № 1 (МАТ № 3)	2023 г.	98,9	97,1	99,2	98,4
Пембролизумаб № 2 (МАТ № 4)	2026 г.	96,6	97,9	97,1	97,8
Устекинумаб (МАТ № 5)	2020 г.	96,0	97,6	97,0	98,4

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

²⁶ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex2>

предложено проводить по раствору СО МАТ, подвергнутому стрессовому воздействию (в результате которого увеличивается содержание фрагмента негликозилированной тяжелой цепи), что позволяет оценить степень разрешения между пиками негликозилированной цепи и мономера. В ВУ разделительная способность системы оценивается по стандартному раствору МАТ, полученному в условиях, аналогичных для испытуемого образца (для ВУ), путем оценки разрешения между пиками легкой и тяжелой цепей. Чувствительность системы в НВУ и ВУ подтверждается по раствору, содержащему анализируемое МАТ в концентрации, соответствующей ПКО.

Последовательность ввода испытуемых образцов. Каждый из растворов, приготовленных в НВУ и ВУ, вводили в количествах кратных «*n*» в нижеприведенной последовательности: холостой раствор (*n*=1), раствор для оценки чувствительности (*n*=1), раствор сравнения (*n*=3), раствор для проверки пригодности электрофоретической системы (*n*=1), испытуемый раствор (*n*=3), раствор сравнения (*n*=1).

Электрофоретический профиль образцов в НВУ и ВУ (рис. 8. Электрофореграмма раствора даратумумаба в невосстанавливающих условиях; рис. 9. Электрофореграмма раствора даратумумаба в восстанавливающих условиях, Опубликован на сайте журнала (Приложение 1)²⁷) представлял собой хорошо разделенные целевые пики. Все электрофореграммы соответствовали требованиям пригодности электрофоретической системы: на электрофореграммах обнаруживался пик внутреннего СО с ММ 10 кДа с временем миграции менее 14,0 мин (12,3–12,9 мин); относительное стандартное отклонение скорректированных площадей основного пика / пика тяжелой цепи для трех последовательных вводов каждого исследуемого раствора (*n*=3) составляло не более 5,0% (0,096–1,410%); относительное стандартное отклонение времен миграции основного пика / пика тяжелой цепи для трех последовательных вводов исследуемого раствора (*n*=3) – не более 2,0% (0–0,413%); отношение пик/долина (*p/v*), рассчитанное для основного пика / пика тяжелой цепи и предшествующего ему пика примеси, – не менее 1,05; фактор симметрии основного пика / пика тяжелой цепи – не более 4,0 (1,14–3,42).

Обработка результатов и анализ результатов испытаний. Содержание примесей фрагментов и примесей ВМС рассчитывали методом внутренней нормализации скорректированных площадей в процентах от общей скорректированной площади всех пиков белковой природы на электрофореграмме. Интегрирование пиков во всех случаях проводилось по варианту с разметкой смежных, не полностью разделенных пиков и «плечевых» пиков примесей путем опускания перпендикуляра из разделяющей пики впадины или точки перегиба к общей базовой линии (как представлено на типичных электрофореграммах (рис. 8. Электрофореграмма раствора даратумумаба в невосстанавливающих условиях; рис. 9. Электрофореграмма раствора даратумумаба в восстанавливающих условиях. Приложение 1. Опубликованы на сайте журнала²⁸)). Не полностью разделенные пики примесей, имеющие общую базовую линию или не имеющие явной точки перегиба, интегрировали совместно и учитывали в любом случае, независимо от индивидуальной интенсивности каждого из таких пиков. Интегрировали и оценивали скорректированные по времени площади всех пиков, мигрирующих после пика внутреннего СО с молекулярной массой 10 кДа до окончания времени электрофоретического разделения (40 мин). Пик с молекулярной массой 10 кДа и сопутствующие пики, представляющие собой «всплески» базовой линии, в расчетах не учитывали.

Невосстанавливающие условия. На электрофореграммах испытуемого раствора и раствора сравнения идентифицировали основной пик как самый высокий пик на электрофореграмме. Пики с временами миграции, предшествующими основному пику, соответствовали пикам низкомолекулярных соединений. Пики с временами миграции, превышающими время миграции основного пика, соответствовали пикам высокомолекулярных соединений. Их интегрировали (рис. 8. Электрофореграмма раствора даратумумаба в невосстанавливающих условиях, Приложение 1. Опубликован на сайте журнала²⁹) и учитывали в расчетах.

Восстанавливающие условия. На электрофореграммах испытуемого раствора и раствора сравнения идентифицировали пики легкой и тяжелой цепей. Неидентифицированные пики с временами миграции, предшествующими пику тяжелой цепи, соответствовали пикам НМС, с временами

²⁷ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex1>

²⁸ Там же.

²⁹ Там же.

миграции, превышающими время миграции пика тяжелой цепи, – пикам ВМС.

В НВУ и в ВУ случаях, когда на электрофореграммах присутствовал пик негликозилированной тяжелой цепи, его относили и нормировали как пик НМС. Все вышеперечисленные пики примесей интегрировали (рис. 9. Электрофореграмма раствора даратумумаба в восстанавливающих условиях, Опубликовано на сайте журнала (Приложение 1)³⁰) и учитывали в расчетах.

Сопутствующие пики «всплесков» базовой линии представляют собой пики, имеющие характерную форму с острыми вершинами, отличную от формы пиков примесей и основных пиков (обладающих гауссоидальной формой и плавной вершиной). Сопутствующие пики считаются допустимыми, если присутствуют в качестве единичных пиков, не интерферируют с целевым пиками, подлежащими оценке, и не мешают их интегрированию.

Валидация методики определения родственных примесей (фрагментов) методом капиллярного гель-электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Данные по валидации были получены двумя аналитиками на разных единицах приборов в разные дни.

Специфичность. Для оценки специфичности методики сравнивали получаемые электрофоретические профили и содержание целевых примесей, определенных с использованием платформенной и оригинальной методик. Значимых отличий между профилями и содержанием примесей выявлено не было. На электрофореграммах растворов плацебо не было обнаружено пиков с временами миграции, совпадающими с временами миграции целевых пиков исследуемых образцов.

Для оценки *предела обнаружения (ПО)* были приготовлены образцы с концентрацией белка 0,003 мг/мл (0,3% от концентрации испытуемого раствора) и 0,005 мг/мл (0,5% от концентрации испытуемого раствора) для НВУ и ВУ соответственно. Для раствора ПО были получены значения соотношения сигнал/шум от 12 до 15 (НВУ) и от 13 до 17 (по пику тяжелой цепи) (ВУ).

Для оценки *предела количественного определения (ПКО)* были приготовлены образцы с концентрацией белка 0,005 мг/мл (0,5% от концентрации испытуемого раствора) и 0,0075 мг/мл (0,75% от концентрации испытуемого раствора) для НВУ и ВУ, соответственно (рис. 10.

Электрофореграмма раствора ПКО в невосстанавливающих условиях; рис. 11. Электрофореграмма раствора ПКО в восстанавливающих условиях. Опубликовано на сайте журнала (Приложение 1)³¹). По результатам оценки чувствительности в НВУ для раствора ПКО были получены значения соотношения сигнал/шум от 20 до 32; в ВУ по пику тяжелой цепи – от 27 до 39.

Линейность методики определяли путем оценки коэффициента детерминации (r^2) линейной регрессии зависимости отклика детектора (по основным пикам) от концентрации испытуемого раствора в диапазоне 0,5–300%. Экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием линейной модели.

Оценку *линейности* и *аналитического диапазона* методики проводили, основываясь на результатах собственных экспериментов и общепринятых нормах содержания примесей низко- и высокомолекулярных соединений, определяемых методами КГЭ (суммарно не более 5–7%). При оценке верхней границы аналитического диапазона опирались на рабочие концентрации МАТ испытуемых/стандартных растворов, принятых в оригинальных методиках – 300% (3 мг/мл) от номинальной концентрации (1 мг/мл). Оценка линейности проводилась аналогично методу ЭХ – в трех диапазонах: нижнем, верхнем и объединенном. Данные линейности нижнего диапазона (в области 0,5–7,0%) получены с использованием 5 точек концентраций; верхнего диапазона (в области 80–300%) получены с использованием 8 точек концентраций; объединенного – 13 точек концентраций. В верхнем диапазоне были приготовлены образцы с концентрациями от 80 до 300% (0,8–3,0 мг/мл) относительно целевой концентрации 1 мг/мл для НВУ и ВУ с точками концентраций 80, 90, 100, 110, 120, 150, 200 и 300%. В нижнем диапазоне концентраций были приготовлены образцы с концентрациями: НВУ от 0,5% (0,005 мг/мл), ВУ 0,75% (0,0075 мг/мл) до 7,0% (0,070 мг/мл (для НВУ и ВУ)) относительно целевой концентрации 1 мг/мл. Объединенные точки концентраций составили: 0,5% (для НВУ) и 0,75% (для ВУ), 80, 90, 100, 110, 120, 150, 200 и 300%.

Для каждой точки концентрации каждым аналитиком готовились по 3 независимые пробы с индивидуальной пробоподготовкой. Статистическую обработку проводили

³⁰ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex1>

³¹ Там же.

по результатам измерения шести независимых проб, одной серии образца каждой из указанных ниже концентраций.

Все зависимости отклика детектора от концентрации линейны, отвечают условию $r \geq 0,99$, что подтверждает линейность данной методики. Аналитический диапазон методики составляет 0,5–300% для НВУ и 0,75–300% для ВУ.

Данные по линейности представлены в Приложении 3 (опубликовано на сайте журнала³²).

Оценку *правильности* методики определяли путем сравнения фактической концентрации и рассчитанной по градуировочному графику зависимости аналитического сигнала от концентрации в верхнем диапазоне концентраций (от 80 до 300%, суммарно для 8 концентрационных точек) (относительно теоретической). По полученным данным рассчитывали общее среднее арифметическое значение данных, полученных обоими аналитиками (суммарно для 48 результатов). Правильность составила: в НВУ от 97,59 до 103,77% (в точке 1 мг/мл – 103, %); в ВУ: для тяжелой цепи от 98,11 до 102,55% (в точке 1 мг/мл – 101,24 %); для легкой цепи от 98,43 до 101,74 % (в точке 1 мг/мл – 101,39%); суммарно по тяжелой и легкой цепям – от 98,43 до 102,24%.

Прецизионность оценивали для концентраций верхнего диапазона, для 8 концентрационных точек: 80, 90, 100, 110, 120, 150, 200 и 300 % от целевой концентрации (1 мг/мл). Статистическую обработку проводили по результатам измерения шести независимых проб, одной серии образца каждой из указанных концентраций с индивидуальной пробоподготовкой каждым из аналитиков, в одних условиях разделения (в общей сложности для 48 результатов ($n=48$)). По полученным данным рассчитывали общее среднее арифметическое значение (между двумя аналитиками), среднеквадратичное отклонение и *RSD*. *RSD* составили:

- НВУ – абсолютное время миграции 0,09–0,18%; относительное содержание интактного иммуноглобулина 0,14–1,01%;
- ВУ – абсолютное время миграции тяжелой цепи 0,14–1,00%, легкой цепи 0,15–1,02%; относительное содержание: тяжелой цепи 0,28–1,0 %, легкой цепи 0,37–0,8%, суммы тяжелой и легкой цепей 0,30–0,75%, что соответствует установленному допустимому разбросу значений по оцениваемым параметрам «не более 5%».

Устойчивость методики оценивали путем варьирования температуры термостата для хранения образцов (20, 25 °С) и сменой капилляра на идентичный, но другой серии, Uncoated Capillary (внутренний диаметр 50 мкм, общая длина 30,2 см из набора SDS-MW Analysis Kit (эффективная длина 20 см), кат. №338451, Lot. M304684, Beckman Coulter), апертура 100×200 мкм. Анализировали по 3 параллельно приготовленным образцам с концентрациями 1,0 мг/мл (НВУ) и 0,8 мг/мл (ВУ).

Устойчивость оценивали по соответствию скорректированных площадей и времен миграции допустимому диапазону, установленному по результатам валидации. Была показана устойчивость методики при варьировании температуры термостата для образцов от 20 до 25 °С, а также при использовании разных лотов идентичных капилляров.

ВЫВОДЫ

Таким образом, нами разработаны методики для определения родственных примесей с использованием методов эксклюзионной ВЭЖХ, капиллярного электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях в препаратах МАТ, которые были апробированы для МАТ 28 различных МНН российского и зарубежного производства.

Разработаны критерии оценки пригодности хроматографических и электрофоретических систем для выбранных условий испытаний.

Валидационные характеристики разработанных методик (специфичность, предел количественного определения, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность, устойчивость) соответствовали установленным критериям приемлемости. Для методики определения ВМС в МАТ методом эксклюзионной хроматографии прецизионность (*RSD*) определения площадей пиков составила: для мономера – до 0,4%, для групп агрегатов – до 8%, для общей площади пиков – до 0,4%, для относительной площади мономера – 0,02%. Линейность методики подтверждена в линейном диапазоне 0,5–120%, правильность – в диапазоне концентраций 99,1–102,1%, предел количественного определения методики составил 0,1%.

Для методики оценки чистоты МАТ метода капиллярного гель-электрофореза в ВУ и НВУ с определением содержания

³² <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex3>

иммуноглобулина, тяжелых и легких цепей, примесей низко- и высокомолекулярных фрагментов, а также негликозилированных фрагментов МАТ, с использованием метода капиллярного гель-электрофореза в ВУ и НВУ: прецизионность составила до 1,0% для относительного содержания основных пиков и до 1,0% для абсолютных времен миграции основных пиков. Линейность методики подтверждена в диапазоне концентраций 0,5–300%, правильность – 97,6–103,7%. Предел количественного определения – 0,5%.

Предлагаемые универсальные методики испытаний могут быть применены на любом этапе жизненного цикла продукта: при производстве (в ходе контроля очистки продукта, этапов хранения очищенного белка или других промежуточных продуктов); при испытаниях фармацевтической субстанции и ЛП (при выпускающем контроле и исследовании стабильности); при валидации производственного процесса; при подтверждении биоаналогичности (аналитической сопоставимости); при оценке сопоставимости производственных процессов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lu RM, Hwang YC, Liu JJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):1. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>
2. Carrara SC, Ulitzka M, Grzeschik J, Kornmann H, Hock B, Kolmar H. From cell line development to the formulated drug product: The art of manufacturing therapeutic monoclonal antibodies. *Int J Pharm.* 2021;594:120164. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120164>
3. Mou X, Yang X, Li H, Ambrogelly A, Pollard D. A high throughput ultra performance size exclusion chromatography assay for the analysis of aggregates and fragments of monoclonal antibodies. *Pharm Bioprocess.* 2014;2(2):141–56.
4. Hernández-Jiménez J, Martínez-Ortega A, Salmerón-García A, Cabeza J, Prados JC, Ortíz R, et al. Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles. *Int J Biol Macromol.* 2018;118(A):511–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.105>
5. Kumar R, Guttman A, Rathore AS. Applications of capillary electrophoresis for biopharmaceutical product characterization. *Electrophoresis.* 2022;43(1–2):143–66. <https://doi.org/10.1002/elps.202100182>
6. Zhang J, Burman S, Gunturi S, Foley JP. Method development and validation of capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for the characterization of a monoclonal antibody. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;53(5):1236–43. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.07.029>
7. Kaur H, Beckman J, Zhang Y, Jian Li Z, Szigeti M, Guttman A. Capillary electrophoresis and the biopharmaceutical industry: Therapeutic protein analysis and characterization. *TrAC Trend Anal Chem.* 2021;144:116407. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116407>
8. Szabo M, Sarkozy D, Szigeti M, Farsang R, Kardos Z, Kozma A, et al. Introduction of a capillary gel electrophoresis-based workflow for biotherapeutics characterization: Size, charge, and N-Glycosylation variant analysis of bamlanivimab, an anti-SARS-CoV-2 product. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:839374. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.839374>
9. Rauniyar N. Characterization of product related variants in therapeutic monoclonal antibodies. *LCGC Int.* 2024;1(6). <https://doi.org/10.56530/lcgc.int.ap3874j8>
10. Dadouch M, Ladner Y, Perrin C. Analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis: Sample preparation, separation and detection. *Separations.* 2021;8(1):4. <https://doi.org/10.3390/separations8010004>
11. Li M, Yu C, Wang W, Wu G, Wang L. Interlaboratory method validation of capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) methodology for analysis of mAbs. *Electrophoresis.* 2021;42(19):1900–13. <https://doi.org/10.1002/elps.202170122>
12. Alhazmi HA, Albratty M. Analytical techniques for the characterization and quantification of monoclonal antibodies. *Pharmaceuticals.* 2023;16(2):291. <https://doi.org/10.3390/ph16020291>

Дополнительная информация. Приложения 1, 2, 3 размещены на сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств». <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex1>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex2>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex3>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: О.А. Ваганова – концепция работы, написание и оформление текста рукописи; Р.С. Смирнов, С.А. Ленин, К.С. Фунташев – разработка методик испытаний, валидация методик; А.А. Костромских – разработка плана валидационных мероприятий; А.С. Перегудова, Д.А. Кадыкова – участие в валидационных мероприятиях; В.А. Меркулов – утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Additional information. Appendices 1, 2, 3 are published on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex1>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex2>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex3>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Olga A. Vaganova elaborated the concept, drafted and formatted the manuscript. Roman A. Smirnov, Sergei A. Lenin, Kirill S. Funtashev performed development and validation of analytical procedure. Anastasiya A. Kostromskikh developed validation plan. Alexandra S. Peregudova, Darya A. Kadykova performed validation of analytical procedures. Vadim A. Merkulov approved the final version of the article for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Ваганова Ольга Александровна, канд. фарм. наук / **Olga A. Vaganova**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2904-7382>

Смирнов Роман Сергеевич, канд. хим. наук / **Roman S. Smirnov**, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8593-1944>

Ленин Сергей Андреевич / **Sergei A. Lenin**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-9808-5760>

Фунташев Кирилл Сергеевич / **Kirill S. Funtashev**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-6074-3318>

Костромских Анастасия Андреевна, канд. хим. наук / **Anastasia A. Kostromskih**, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5588-5801>

Перегудова Александра Сергеевна / **Aleksandra S. Peregudova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8187-1008>

Кадыкова Дарья Алексеевна / **Darya A. Kadykova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-9087-0630>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. / **Vadim A. Merkulov**, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 30.01.2025

После доработки 28.04.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Received 30 January 2025

Revised 28 April 2025

Accepted 6 June 2025



Е.О. Чечетова ✉ 
Н.П. Неугодова 
О.В. Шаповалова 

Метод определения пирогенности с использованием моноцитов: перспективы и особенности применения (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

✉ Чечетова Екатерина Олеговна; stepanuk@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Отсутствие пирогенных загрязнений относится к критическим показателям качества лекарственных средств, гарантирующим сохранение жизни и здоровья пациентов. С целью контроля подобных веществ в середине XX века в практику был внедрен биологический показатель «Пирогенность», в основе которого лежит оценка реакции кроликов на введение испытуемого образца. Следуя концепции ЗР в 2009 г. в Европейскую фармакопею помимо испытания на кроликах включена монография альтернативного метода *in vitro* – тест активации моноцитов. В отечественную фармакопею данный тест включен в 2018 г. (ОФС.1.2.4.0016.18 «Тест активации моноцитов»). Однако на сегодняшний день метод не получил широкого применения среди производителей ни в России, ни за рубежом ввиду особенностей проведения теста, связанных с потребностью значительного количества человеческой крови для получения моноцитов, с ограниченным выбором наборов реактивов и др. Испытание «Пирогенность» по-прежнему остается востребованным в области определения пирогенных примесей любой природы (бактериальных эндотоксинов и неэндотоксиновых пирогенов). Для более полной гармонизации с европейскими требованиями, реализации концепции ЗР, связанной с гуманным отношением к животным, внедрение теста активации моноцитов является одной из приоритетных задач развития системы контроля качества лекарственных средств.

ЦЕЛЬ. Оценка возможности применения теста активации моноцитов в качестве основного для определения неэндотоксиновых пирогенов.

ОБСУЖДЕНИЕ. В статье описаны фармакопейные методы определения пирогенных веществ, детально проанализирован метод определения пирогенов с использованием клеток крови человека – моноцитов. В настоящее время испытание на активацию моноцитов – единственный тест *in vitro*, позволяющий определять наличие пирогенов любой природы (бактериальные эндотоксины и пирогены неэндотоксиновой природы). Тест является достойным примером реализации стратегии замены испытаний на животных, позволяет определять примеси в случаях, когда контроль с помощью иных методик вызывает сложности или его невозможно выполнить. Главным недостатком, который затрудняет внедрение теста в рутинный контроль, является ограниченная доступность человеческой крови в качестве источника моноцитов. Обсуждены возможные источники моноцитов, которые могут быть применены при определении пирогенности, в том числе клетки крови животных. В соответствии с тенденцией к замене испытания *in vivo* – «Пирогенность» на альтернативный метод *in vitro* показана необходимость освоения применения метода при контроле качества биологических и иммунобиологических лекарственных средств.

ВЫВОДЫ. По итогам проведенного теоретического анализа возможности применения метода *in vitro* в качестве основного для определения в первую очередь неэндотоксиновых пирогенов установлено, что мировое сообщество серьезно настроено на отказ от использования животных. Тест активации моноцитов включен в большинство фармакопей мира, а также в отечественную фармакопею, и рекомендован для выполнения в качестве основного контроля содержания пирогенов в лекарственных средствах.

Ключевые слова: пирогенность; пироген; бактериальные эндотоксины; пирогены неэндотоксиновой природы; альтернативные методы; тест активации моноцитов; клетки крови человека; принцип 3R; лекарственные средства; иммунобиологические препараты

Для цитирования: Чечетова Е.О., Неугодова Н.П., Шаповалова О.В. Метод определения пирогенности с использованием моноцитов: перспективы и особенности применения (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(3):347–356. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-347-356>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200096-0).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ekaterina O. Chechetova 
Natalia P. Neugodova 
Olga V. Shapovalova 

Method for Determining Pyrogenicity Using Monocytes: Prospects and Features of Application (Review)

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

✉ Ekaterina O. Chechetova; stepanuk@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Determination of pyrogenic contaminants in medicines is a critical quality indicator that guarantees the preservation of life and health of patients. In order to control such substances, the biological indicator “Pyrogenicity” was introduced in the middle of the 20th century, which is based on the assessment of the reaction of rabbits to the introduction of the test sample. In accordance with the 3R concept, since 2009, in addition to testing on rabbits, the European Pharmacopoeia has included a monograph of an alternative *in vitro* method – the Monocyte Activation Test. This test was included in the domestic pharmacopoeia in 2018 (OFS.1.2.4.0016.18 “Monocyte Activation Test”). However, to date, the method has not received wide application among manufacturers either in Russia or abroad due to the peculiarities of the test, related to the need for a significant amount of human blood to obtain monocytes, with a limited choice of reagent kits, etc. The “Pyrogenicity” test is still in demand in the field of determining pyrogenic impurities of any nature (bacterial endotoxins and non-endotoxin pyrogens). For more complete harmonization with European requirements, implementation of the 3R concept related to humane treatment of animals, the introduction of the monocyte activation test is one of the priority tasks.

AIM. Evaluation of the possibility of using the monocyte activation test as a primary test for the determination of non-endotoxin pyrogens.

DISCUSSION. The article describes pharmacopoeial methods for determining pyrogenic substances, analyzes in detail the method for determining pyrogens using human blood cells – monocytes. Currently, the monocyte activation test is the only *in vitro* test that allows determining the presence of pyrogens of any nature (bacterial endotoxins and non-endotoxin pyrogens). The test is a worthy example of implementing the strategy of replacing animal tests, it allows determining impurities in cases where control using other methods causes difficulties or cannot be performed. The main disadvantage that complicates the implementation of the test in routine control is the limited availability of human blood as a source of monocytes. Possible sources of monocytes that can be used to determine pyrogenicity, including animal blood cells, are discussed. In accordance with the trend to replace the *in vivo* test – “Pyrogenicity” with an alternative *in vitro* method, the need to master the application of the method in relation to biological and immunobiological medicinal products is shown.

CONCLUSIONS. Based on the results of the theoretical analysis of the possibility of using the *in vitro* method as the main method for determining, first of all, non-endotoxin pyrogens, it was established that the world community is seriously

determined to refuse the use of animals. The monocyte activation test is included in most pharmacopoeias of the world, as well as in the domestic pharmacopoeia, and is recommended for implementation as the main control.

Keywords: pyrogenicity; pyrogen; endotoxins; non-endotoxin pyrogens; monocyte activation test; monocytes; human blood cells; 3R principle; medicinal products; immunobiological preparations; *in vitro*

For citation: Chechetova E.O., Neugodova N.P., Shapovalova O.V. Method for determining pyrogenicity using monocytes: Prospects and features of application (Review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(3):347–356. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-347-356>

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. 124022200096-0).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с руководящими принципами этичного использования лабораторных животных (принципы 3R: Replacement, Reduction, Refinement)¹ научное сообщество старается минимизировать их применение в качестве тест-систем для лабораторных исследований. Один из постулатов данной концепции – замена биологических испытаний альтернативными методиками *in vitro* и (или) *in silico*². Ярким примером воплощения данной стратегии является внедрение метода определения пирогенных веществ *in vitro* («Тест активации моноцитов»), который был разработан на смену биологическому методу определения пирогенов на кроликах – «Пирогенность».

Пирогены – это класс химически гетерогенных веществ, вызывающих повышение температуры тела, которые представлены бактериальными эндотоксинами (БЭ) (продуктами жизнедеятельности бактерий, вирусов, грибов), а также пирогенами неэндотоксиновой природы (НЭП) (различными химическими соединениями, например фторопластами, нуклеатами и др.) [1, 2]. Контроль их содержания в лекарственных средствах (с микробиологической чистотой категории 1.2.Б) и лекарственных препаратах (ЛП) для парентерального введения, а также для медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) является жизненно необходимой процедурой – при введении препаратов с примесями пирогенных веществ может произойти

нарушение терморегуляции, сопровождающееся тяжелыми реакциями интоксикации вплоть до летального исхода³.

С целью обеспечения контроля содержания пирогенных примесей в 1942 г. в Фармакопею США (USP) был введен биологический показатель «Пирогенность»⁴, принцип которого основан на измерении ректальной температуры тела кроликов до и после внутривенного введения испытуемого образца. Со временем данный показатель был включен и в другие фармакопеи. В 2009 г. в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EU⁵ и принципами 3R⁶, направленными на сокращение применения животных в научных целях, был предложен новый метод определения пирогенных веществ – «Тест активации моноцитов» (MAT), в котором в качестве тест-системы используют клетки крови человека (моноциты).

Цель работы – оценка возможности применения теста активации моноцитов в качестве основного для определения неэндотоксиновых пирогенов. Задачами работы являются: обзор однонаправленных методов⁷ определения пирогенности; описание преимуществ и недостатков теста активации моноцитов при определении пирогенов любой природы; обзор специфики возможных источников моноцитов и применения их в испытании; рассмотрение тенденций внедрения MAT взамен классического биологического испытания на кроликах.

¹ Russell W, Burch R. Principles of humane experimental techniques. London: Methuen & Co; 1959.

² [Альтернативы экспериментам на животных. Проект организации «Врачи против экспериментов на животных».](#)

³ Лютинский СИ. Патологическая физиология сельскохозяйственных животных. М.: КолосС; 2002.

⁴ General chapter <151> Pyrogen test. USP43–NF38. Rockville; 2024.

⁵ Директива Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 № 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных целях.

⁶ Russell W, Burch R. Principles of humane experimental techniques. London: Methuen & Co; 1959.

⁷ Под однонаправленными подразумеваются не универсальные методы, характеризующиеся высокой селективностью по отношению к одному (нескольким) видам пирогенов [3].

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПИРОГЕННОСТИ

На сегодняшний день на территории Российской Федерации контроль пирогенных веществ может быть осуществлен с помощью различных методологических подходов: биологического метода («Пирогенность»), а также методов *in vitro* («Бактериальные эндотоксины» и «Тест активации моноцитов»).

Долгие годы контроль наличия пирогенных веществ любой природы проводили путем биологического испытания «Пирогенность». Основанием для разработки универсальных методов *in vitro* послужило стремление сделать испытание на пирогенность более гуманным, так как основной недостаток биологического метода — использование животных. Другими недостатками метода являются отсутствие возможности получения количественного ответа, а также контроля некоторых групп препаратов в силу их фармакологических свойств (например, анальгетиков, седативных препаратов, миорелаксантов, средств для наркоза и т.п.) [1]. Также фактором, ограничивающим применение метода «Пирогенность», является растворимость фармацевтических субстанций. Так, например, субстанции, растворимые только в органических растворителях, невозможно ввести кроликам внутривенно.

Снизить количество используемых лабораторных животных удалось с появлением *in vitro* испытания «Бактериальные эндотоксины», специфичного к БЭ, которые являются основными пирогенными примесями. Их содержание определяют с помощью лизата амёбоцитов мечехвостов *Limulus polyphemus* или *Tachypleus tridentatus* (ЛАЛ-тест или ТАЛ-тест). Испытание основано на специфической реакции природного или генно-инженерного реактива с БЭ⁸. Тест обладает значительными преимуществами в определении БЭ по отношению к методу «Пирогенность» (скорость получения результатов, сниженные издержки, отсутствие влияния фармакологических свойств препарата, количественное определение эндотоксиновых

примесей, возможность валидации метода) и в короткие сроки стал востребованным во всем мире.

«Тест активации моноцитов» *in vitro* — клеточная методика определения пирогенных веществ любой природы — является примером воплощения стратегии по исключению животных из лабораторных испытаний. Предполагалось, что внедрение этого испытания в фармацевтическую практику должно привести к значительному снижению числа животных, используемых в тесте, что соответствует «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей»⁹. Однако процесс перехода от испытания на кроликах к клеточной методике занял продолжительное время¹⁰, тогда как ЛАЛ-тест в России с момента утверждения общей фармакопейной статьи (ОФС) в 2000 г.¹¹ в течение пяти лет был внедрен более чем на половине производств, выпускающих инъекционные препараты, вследствие чего значительно возросло количество нормативных документов для инъекционных ЛП, которые, согласно требованиям, должны подвергаться испытанию с помощью ЛАЛ-теста взамен испытанию на животных [4, 5].

Впервые статьи об использовании цельной крови для определения пирогенов были опубликованы в середине 1990-х гг. [6]. В 2009 г. в Европейскую фармакопею (Ph. Eur.) введена монография «Monocyte Activation Test»¹², а в 2018 г. на ее основе была создана отечественная ОФС «Тест активации моноцитов»¹³. В основе данного метода лежит воспроизведение механизма развития лихорадки с помощью клеток крови человека — моноцитов или моноцитоподобных клеток. Тест на клеточном уровне воспроизводит испытание «Пирогенность». В испытании используют стандартные образцы эндотоксиновой и неэндотоксиновой природы. Для обнаружения БЭ применяют контрольный стандарт эндотоксина, растворы которого в разных концентрациях используют для построения калибровочной кривой. В качестве «неэндотоксинового контроля» используют растворы липотейхоевой кислоты, флагеллина,

⁸ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018. ОФС.2.1.6.12 Испытание на бактериальные эндотоксины с использованием рекомбинантного фактора. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. 1, ч. 3. М.; 2024.

General chapter 2.6.32 Test for bacterial endotoxins using recombinant factor C. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2024.

⁹ [Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. ETS No. 123, 18.03.1986.](#)

¹⁰ [Ph. Eur. bids adieu to rabbit pyrogen test in its monographs. Charton E. European Pharmacopoeia approach to testing for pyrogenicity. American Pharmaceutical Review; 2022.](#)

¹¹ ОФС.42-0002-00 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд. М.; 2008.

¹² General chapter 2.6.30 Monocyte activation test. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2024.

¹³ ОФС.1.2.4.0016.18 Тест активации моноцитов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

термоинактивированного *Staphylococcus aureus* и др. (рис. 1). С помощью неэндотоксиновых стандартов для каждого конкретного испытуемого образца оценивается способность клеток давать иммунный ответ на взаимодействие с пирогенами, отличными от БЭ.

МАТ возможен в трех вариантах постановки¹⁴: количественное испытание (А); полуколичественное испытание (В); сравнительное испытание с серией лекарственного средства, утвержденной в качестве контрольной¹⁵ (С) [1]. Методы А и В пригодны для контроля ЛС, не обладающих пирогенными свойствами. Метод С разработан с целью контроля содержания пирогенных примесей в ЛП или МИБП, обладающих пирогенными свойствами (например, вакцина для профилактики менингококковой инфекции). Его особенность заключается в сравнении реакции испытуемого образца с реакцией контрольной серии, а не со стандартами пирогенов¹⁶.

КЛЕТКИ КРОВИ КАК ПРЕДМЕТ ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕСТА АКТИВАЦИИ МОНОЦИТОВ

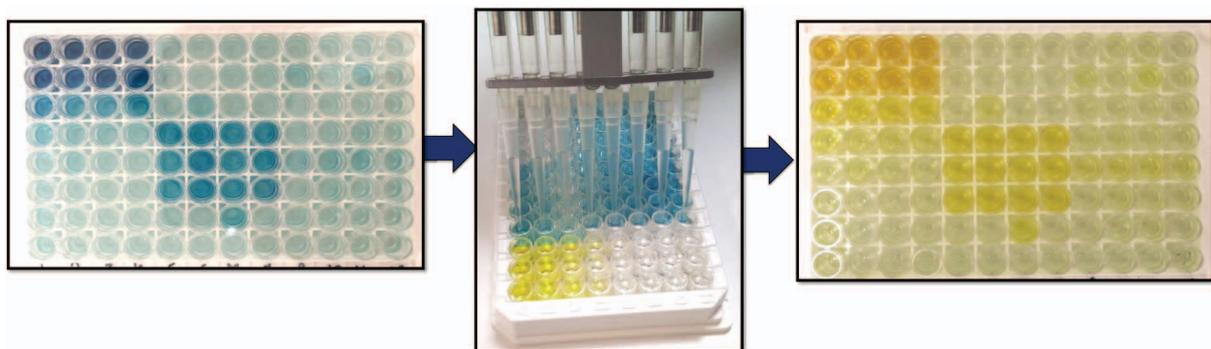
При внедрении показателя МАТ в рутинный контроль представители фармацевтической промышленности могут столкнуться с трудностями, вызванными необходимостью работы с форменными элементами крови человека. Во-первых, логистическая проблема, связанная с большим количеством требуемой цельной крови или выделенных моноцитов, особыми условиями их получения и транспортировки. Во-вторых, высокие требования к качеству крови, например: квалификация, количество клеток

в 1 мл, экспрессия, характеристики доноров, специфичность получаемых клеток. Такие требования связаны с отсутствием возможности стандартизации факторов, влияющих на индивидуальные генетические особенности и жизнедеятельность (сопутствующие заболевания, образ жизни, питание и др.) доноров [7].

Для проведения испытания моноциты можно получать самостоятельно в лаборатории или использовать готовые клетки из коммерческих наборов. Источниками тест-объекта могут быть как клеточная линия или мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК), так и цельная кровь или пулы цельной крови, которые квалифицируются в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ)¹⁶. Особенности выполнения работ с клетками зависят от выбранного источника моноцитов:

Цельная кровь. Для получения МКПК используют нативную цельную кровь не менее чем от 4 здоровых доноров. Оптимальная концентрация готовой клеточной суспензии для испытания – $1,0 \times 10^7$ клеток в 1 мл. При работе с данным источником клеток требуется соблюдение строгих правил работы с биологическими жидкостями, наличие компетентных сотрудников, а также специализированное оборудование¹⁷.

Клеточная линия Mono Mac 6 (ММ6) впервые была получена в 1988 г. из периферической крови пациента с острым лейкозом при помощи клонирования. К линии моноцитов она отнесена на основании морфологических, цитохимических и иммунологических критериев, которые



Фотографии выполнены авторами / The photographs were taken by the authors

Рис. 1. Цветная реакция в лунках, содержащих пирогены, после добавления стоп-реагента

Fig. 1. Color reaction in wells containing pyrogens after addition of stop reagent

¹⁴ ОФС.1.2.4.0016.18 Тест активации моноцитов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

¹⁵ Контрольную серию, заведомо не содержащую пирогенные вещества, в препарате в качестве примесей, создают на производстве.

¹⁶ ОФС.1.2.4.0016.18 Тест активации моноцитов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

¹⁷ Приказ Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 18.12.2020 № 928н «Об утверждении Правил по охране труда в медицинских организациях».

подтвердили фенотипические и функциональные особенности зрелых моноцитов [8, 9]. Так как ММ6 была получена путем клонирования, перед ее использованием необходимо исключить возможные мутации клеток, а также оценить их функциональную стабильность и экспрессию (способность улавливать пирогены)¹⁸.

Клеточная линия ММ6 чувствительна как к грамположительным, так и к грамотрицательным бактериям, но нечувствительна к дрожжам и спорам грибов [10], в связи с чем моноциты этой линии несколько уступают по активности живым клеткам. Причиной этому является искусственное поддержание жизни клеток ММ6. Так при появлении новой клетки набор специализированных для иммунного ответа и выработки цитокинов толл-подобных рецепторов (TLR), находящихся на поверхности моноцитов, может быть неполон, в отличие от моноцитов, выделенных из крови здорового человека. Так, TLR2 распознает бактериальные патоген-ассоциированные молекулы паттернов – липотейхоевые кислоты, липоарабиноманнаны, пептидогликан и некоторые другие, TLR4 – липополисахариды грамотрицательных бактерий [11]. В случае их отсутствия клонированные клетки становятся нечувствительными к ряду пирогенов, поэтому ММ6 считается ограниченной в способности обнаруживать НЭП¹⁹.

Криоконсервированные моноциты (квалифицированные, подсчитанные и рассчитанные на одно испытание) являются наиболее удобным и практичным источником клеток и позволяет использовать нужное количество клеток, отвечающих морфологическим и функциональным критериям. Главной задачей при работе с ними является обеспечение жизнеспособности клеток после размораживания, так как моноцитарные клетки сохраняют свою жизнеспособность при температуре не выше –80 °С. Процедуру оттаивания следует проводить на водяной бане при температуре 37 °С в течение 2–3 мин. В случае длительного и постепенного размораживания существует вероятность гибели клеток в результате действия консерванта диметилсульфоксида, контакт с которым в жидкой фазе приводит к снижению жизнеспособности моноцитов [12]. При транспортировке и хранении следует строго соблюдать температурный режим. Следует отметить, что выполнение теста с использованием свежевыделенных МКПК дает

более надежные результаты при обнаружении пирогенов в ЛП [12].

Вне зависимости от способа получения моноцитов клетки обязательно должны быть квалифицированы перед проведением испытания. Для этого необходимо определить чувствительность моноцитов к эндотоксинам посредством построения стандартной калибровочной кривой зависимости взаимодействия моноцитов с эндотоксинами разной концентрации²⁰.

Необходимо учитывать, что при внедрении показателя в рутинный контроль потребление здоровой человеческой цельной крови возрастет в разы. Чтобы избежать перерасхода материала, жизненно необходимого людям, учеными предпринимаются попытки использовать в качестве источника моноцитов клетки крови животных. Так, немецкие ученые рассмотрели возможность использования клеток крупного рогатого скота. В пользу применения бычьей крови свидетельствует, например, то, что набор TLR лейкоцитов быка сравним с человеческими, а также сообщения о прямых попытках использовать кровь быка для обнаружения бактериальных эндотоксинов (липолисахаридов) [7]. Следует отметить, что условия содержания животных и контроль за содержанием конкретных патогенов можно стандартизировать, что позволит получать клетки более однородного качества.

Ученые из Южной Кореи разработали и внедрили в практику тест «Rabbit MAT» с моноцитами крови кроликов. Авторы полагают, что моноциты кроликов более чувствительны, чем моноциты человека [13]. На сегодняшний день MAT с клетками крови животных имеет экспериментальный единичный характер и не получил широкого распространения на практике.

ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ТЕСТА АКТИВАЦИИ МОНОЦИТОВ

Основными преимуществами MAT являются:

- 1) возможность замены показателя «Пирогенность» *in vitro*; возможность определения содержания как БЭ, так и НЭП без использования животных (что не позволяют иные, однонаправленные методы *in vitro*);
- 2) расширение области контроля ЛС на наличие пирогенных веществ любой природы. В биологическом испытании тест-доза, которая вводится на килограмм массы кролика, всегда

¹⁸ ОФС.1.2.4.0016.18 Тест активации моноцитов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

¹⁹ General chapter 2.6.30 Monocyte activation test. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg: EDQM; 2019.

[ISCVAM-recommended test method protocol The monocytoid cell line Mono Mac 6 / Interleukin-6 in vitro pyrogen test, 2008.](#)

²⁰ ОФС.1.2.4.0016.18 Тест активации моноцитов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

выше терапевтической, что связано с более низкой чувствительностью кроликов к пирогенам по сравнению с человеком. Некоторые образцы ввиду своих фармакологических и (или) физических свойств не могут тестироваться на животных, так как при внутривенном введении это может привести к интоксикации живого организма или даже к летальному исходу, а МАТ позволяет контролировать подобные образцы [1];

3) возможность контроля испытуемых образцов, для которых сложно устранить влияние мешающих факторов в испытании «Бактериальные эндотоксины»²¹. Так, например, при контроле альбумина, содержащего большое количество бета-глобулинов, взаимодействующих с лизатом амёбоцитов, возможно получение ложноположительных результатов, в то время как использование МАТ позволит этого избежать [14];

4) наличие нескольких методов (А, В и С), которые позволяют применять испытание для групп фармацевтических средств МИБП, обладающих пирогенными свойствами. В таком случае испытание проводят с использованием стандарта сравнения — серии образца, в которой содержится регламентированное количество пирогенов (Метод С).

К основным недостаткам МАТ относят следующие (рис. 2):

1) больше времени (до 48 ч), чем в случае исследования биологическим методом на кроликах (3–5 ч);

2) многостадийность и длительность процесса повышает риск возможного возникновения ошибок (человеческий фактор);

3) специфическая квалификация персонала, допуск персонала к работе с кровью;

4) дополнительное оборудование для подсчета клеток, их замораживания и хранения;

5) большое количество донорской крови человека для получения моноцитов, необходимых для основного эксперимента, и для проведения предварительных испытаний по определению мешающих факторов (например, ингибирование

выработки цитокинов, варьирование экспрессии клеток и др.).

ВНЕДРЕНИЕ МЕТОДА В ПРАКТИКУ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

В настоящее время МАТ включен в большинство фармакопей мира (страны ЕАЭС, страны Европы, Индия, Корея, Российская Федерация), в некоторых странах (США и Китай) тест выполняют в соответствии с руководствами²², в которых описаны условия его применения [15].

Несмотря на введение метода *in vitro* в качестве фармакопейного для определения пирогенных примесей любой природы, производители не спешат переходить на клеточную методику²³. Это подтверждается результатами опроса²⁴, опубликованными в 2018 г. на ежегодной конференции Европейского партнерства по альтернативным подходам к тестированию на животных (ЕРАА)²⁵, проведенного среди европейских компаний и испытательных институтов, которые все еще регулярно проводят испытания на кроликах. Было установлено, что при наличии фармакопейного метода *in vivo* стимулов для внедрения МАТ недостаточно²⁶. Еще одной причиной незавершенного перехода на клеточную методику является отсутствие международной гармонизации требований к определению пирогенных примесей — правила применения МАТ в разных странах отличаются, что напрямую влияет на введение метода в нормативной документации [16].

Согласно ст. 13 «Выбор методов» Директивы ЕС 2010/63/EU²⁷ единственным выходом из ситуации является полное исключение биологического метода из Европейской фармакопей. Для ускорения целенаправленного процесса перехода на использование МАТ в качестве основного метода в декабре 2024 г. Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) опубликовало проект документа нормативных требований к испытаниям ЛС и возможности

²¹ ОФС.1.2.4.0016.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

²² General chapter 9301 Guidelines for the application of safety tests for injections. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing; 2020.

Guidance for industry: Pyrogen and endotoxins testing: Questions and answers. FDA; 2012.

²³ [Charton E. European Pharmacopoeia approach to testing for pyrogenicity. American Pharmaceutical Review; 2022. Ph. Eur. bids adieu to rabbit pyrogen test in its monographs.](#)

²⁴ [Charton E. European Pharmacopoeia approach to testing for pyrogenicity. American Pharmaceutical Review; 2022.](#)

²⁵ [European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing \(EPAA\). EPAA Annual Conference 2018: Pooling resources to promote the use of alternative methods for advancing safety assessment.](#)

²⁶ https://www.edqm.eu/en/-/ph.-eur.-bids-adieu-to-rabbit-pyrogen-test-in-its-monographs?p_l_back_url=%2Fen%2Fsearch%3Fq%3Dpyrogen

²⁷ Директива Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 № 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных целях.



Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 2. Характеристика метода определения пирогенности с использованием моноцитов

Fig. 2. Characteristics of the method for determining pyrogenicity using monocytes

внедрения принципов 3R²⁸, в котором описана рабочая программа, включающая план по исключению показателя «Пирогенность» к январю 2026 г. Для регистрации новых ЛП, в том числе и МИБП, необходимо предоставлять данные об отсутствии пирогенных веществ, подтвержденные только с помощью МАТ²⁹.

В июле 2025 г. в Ph. Eur. 11 изд. (приложение 11.8) планируется утверждение главы 5.1.13 Pyrogenicity³⁰, которая включает в себя описания всех испытаний, направленных на обнаружение пирогенных примесей³¹. В июле 2024 г. была опубликована новая отдельная монография, касающаяся вакцин, содержащих пирогенные вещества³². В настоящее время МАТ регламентирован в Ph. Eur. только для одной действующей частной монографии 01/2018:0896 «Deferoxamine mesilate», в которой есть указание о причине выбора данного метода (ингибирующее действие на реактив) взамен показателя «Бактериальные эндотоксины». Такой же метод испытания рассматривается в проекте монографии 07/2025:2537 «3-O-Desacyl-4'-monophosphoryl lipid A».

В Фармакопее США в некоторые частные монографии до сих пор включен тест на кроликах, но в соответствии с руководством³³ для производителей для определения содержания пирогенных примесей допускается использование МАТ при наличии валидационных материалов об альтернативности методов. Для медицинских изделий, для которых повышен риск содержания НЭП, рекомендуется использовать испытания *in vivo*, а именно, следовать монографии USP <151> Pyrogenicity test. Для снижения количества испытаний на животных в некоторых случаях, валидированных согласно USP <1225> Validation of compendial procedures, достаточно использования теста на бактериальные эндотоксины USP <85> Bacterial endotoxin test.

В России метод МАТ практически не используется, несмотря на то что он введен в Государственную фармакопею Российской Федерации XIV изд.³⁴, и не регламентирован ни в одной фармакопейной статье (ФС). Напротив, биологическое испытание «Пирогенность» описано в 63 ФС, 15 из которых для ЛС, остальные для МИБП.

²⁸ Reflection paper on the current regulatory testing 4 requirements for medicinal products for human use and 5 opportunities for implementation of the 3Rs. EMA; 2024.

²⁹ Strategy for removing or replacing the rabbit pyrogen test: New pyrogenicity strategy of the European Pharmacopoeia Commission, 2022.

³⁰ Там же.

³¹ General chapter 2.6.14 Bacterial endotoxin; 2.6.30 Monocyte activation test; 2.6.32 Recombinant factor C. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2024.

³² General chapter 2.6.40. Monocyte-activation test for vaccines containing inherently pyrogenic components. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg: EDQM; 2019.

³³ Guidance for industry: Pyrogen and endotoxins testing: Questions and answers. FDA; 2012.

³⁴ ОФС.1.2.4.0016.18 Тест активации моноцитов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

В связи с гармонизацией с Европейской фармакопеей, а именно с изменением монографии «2.6.30 Monocyte-activation test»³⁵ и введением монографии «2.6.40 Monocyte-activation test for vaccines containing inherently pyrogenic components»³⁶, планируется пересмотр российской ОФС 1.2.4.0016.18 и введение отдельной статьи с описанием МАТ для вакцин, содержащих пирогенные вещества. Основные изменения коснутся методов постановки испытания: на выбор будут предложены два варианта постановки вместо трех: полуколичественный метод и сравнительное испытание с контрольной серией.

С целью решения вопроса о сокращении использования лабораторных животных в контроле пирогенных примесей авторами публикации был проведен теоретический анализ, в котором была оценена необходимость наличия биологического показателя в ФС для ЛС природного происхождения. В ходе анализа ряда нормативных документов было установлено, что для некоторых препаратов допустим контроль только бактериальных эндотоксинов, поскольку технологии производства и соблюдение правил GMP позволили минимизировать риск загрязнения неэндотоксиновыми пирогенами, что подтверждено многолетними результатами контроля. Такой подход позволит не только снизить количество используемых животных для метода *in vivo*, но и сократить перечень наименований препаратов, для которых необходим переход на МАТ, что, в свою очередь, напрямую влияет на снижение потребности в донорской крови, необходимой для его проведения. В настоящее время на территории РФ доступны готовые наборы реактивов для проведения теста *in vitro*, которые рассчитаны на постановку одного испытания. Это значительно облегчает выполнение теста, так как в работу берут необходимое количество подготовленных и квалифицированных моноцитов. Исследователям не нужно специально

выделять клетки из крови, что заметно упрощает процесс испытания, способствует освоению теста и оценке возможного применения для контроля качества ЛС и МИБП на наличие пирогенных примесей.

Так как на регистрацию уже начали поступать образцы, в которых валидационные материалы представлены с использованием МАТ³⁷, российским производителям и контрольным органам необходимо приступить к освоению данной методики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внедрение метода *in vitro* как основного инструмента контроля пирогенных примесей любой природы связано с рядом существенных препятствий. В первую очередь должны быть урегулированы вопросы логистики и ценообразования, касающиеся источников клеток и необходимых реактивов. На данный момент эти проблемы определяют меньшую востребованность метода *in vitro* по сравнению с классическими однонаправленными методами определения пирогенных примесей. Прежде чем полностью отказываться от традиционного биологического испытания, необходимо провести тщательную и всестороннюю валидацию альтернативного метода.

Однозначно оценить перспективы применения клеточного метода на территории России в настоящее время сложно, так как отсутствуют практические данные. МАТ – единственный реальный путь отказа от животных при определении пирогенов неэндотоксиновой природы. Следовательно, производителям и контрольным службам необходимо приступить к освоению теста активации моноцитов. Наличие доступных наборов реактивов с готовыми выделенными моноцитами является хорошей поддержкой в освоении метода.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Багирова ВЛ, Митькин ОД, Митькина ЛИ. Тест на активацию моноцитов как альтернатива тесту «пирогенность» на кроликах. *Фармация*. 2010;(7):40–1. Bagirova VL, Mitkin OD, Mitkina LI. The monocyte activation test as an alternative to the rabbit pyrogen test. *Pharmacy*. 2010;(7):40–1 (In Russ.). EDN: [LTMHRW](https://doi.org/10.1080/00365540310016259)
2. Moreillon P, Majcherczyk PA. Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand J Infect Dis*. 2003;35(9):632–41. <https://doi.org/10.1080/00365540310016259>
3. Неугодова НП, Рябцева МС, Сапожникова ГА. Основные требования к биологическим показателям при оценке качества лекарственных средств. Возможности валидации биологических методов контроля. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;(3):3–8. Neugodova NP, Ryabtseva MS, Sapozhnikova GA Basic requirements for biological criteria in drug quality evaluation. validation of biological control methods. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(3):3–8 (In Russ.). EDN: [WKNSOZ](https://doi.org/10.1080/00365540310016259)

³⁵ General chapter 2.6.30 Monocyte-activation test. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2024.

³⁶ General chapter 2.6.40. Monocyte-activation test for vaccines containing inherently pyrogenic components. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg: EDQM; 2019.

³⁷ Материалы работ, выполняемых в рамках уставной деятельности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

4. Ситников АГ, Долгова ГВ, Неугодова НП. Анализ «Бактериальные эндотоксины» в отечественной нормативной документации. *Бюллетень ЛАЛ-тест*. 2008;(1):1–3. Sitnikov AG, Dolgova GV, Neugodova NP. Analysis of “Bacterial endotoxins” in domestic regulatory documentation. *LAL-test Bulletin*. 2008(1):1–3 (In Russ.).
5. Ситников АГ, Неугодова НП, Долгова ГВ, Йорданова-Пашевич А. ЛАЛ-тест в России – итоги пяти лет внедрения метода в практику фармацевтического производства. *Бюллетень ЛАЛ-тест*. 2002;(1):1–8. Sitnikov AG, Neugodova NP, Dolgova GV, Yordanova-Pashevich A. LAL-test in Russia – results of five years of introduction of the method into pharmaceutical production practice. *LAL-test Bulletin*. 2002;(1):1–8 (In Russ.).
6. Hartung T, Wendel A. Detection of Pyrogens using human whole blood. *ALTEX*. 1995;12(2):70–5. PMID: 11178418.
7. Wunderlich C, Schumacher S, Kietzmann M. Pyrogen detection methods: Comparison of bovine whole blood assay (bWBA) and monocyte activation test (MAT). *BMC Pharmacol Toxicol*. 2014;15:50. <https://doi.org/10.1186/2050-6511-15-50>
8. Ziegler-Heitbroc H, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Rietzmüller G. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer*. 1988;41(3):456–61. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910410324>
9. Akula S, Lara S, Olsson A-K, Hellman L. Quantitative analysis of the transcriptome of two commonly used human monocytic cell lines – THP-1 and Mono Mac 6 – Reveals their arrest during early monocyte/neutrophil differentiation. *Int J Mol Sci*. 2022;23(10):5818. <https://doi.org/10.3390/ijms23105818>
10. Moesby L, Hansen EW, Christensen JD. Ultrasonication of pyrogenic microorganisms improves the detection of pyrogens in the Mono Mac 6 assay. *Eur J Pharm Sci*. 2000;11(1):51–7. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00080-4](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00080-4)
11. Тюкавкина СЮ, Лабушкина АВ, Оксенюк ОС. Роль toll-подобных рецепторов в иммунопатогенезе нефропатий. *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. 2017;(1):17–26. Tyukavkina SYu, Labushkina AV, Oksenyuk OS. The role of toll-like receptors in the immunopathogenesis of the nephropathies with fibrosis. *Journal of Fundamental Medicine and Biology*. 2017;(1):17–26 (In Russ.). EDN: ZSIYPI
12. Koryakina A, Frey E, Bruegger P. Cryopreservation of human monocytes for pharmacopeial monocyte activation test. *J Immunol Methods*. 2014;405:181–91. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.01.005>
13. Kim JH, Jung K, Kim J, Lee J, Kim H, Song H, et al. Development of a rabbit monocyte activation test as an alternative to the rabbit pyrogen test and its application in the analysis of plasma-derived products. *Biologicals*. 2021;71:20–30. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2021.04.003>
14. Perdomo-Morales R, Pardo-Ruiz Z, Spreitzer I, Lagarto A, Montag T. Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin. *ALTEX*. 2011;28(3):227–35. <https://doi.org/10.14573/altex.2011.3.227>
15. Xu X, Xu H, Shang Y, Zhu R, Hong X, Song Z, Yang Z. Development of the general chapters of the Chinese Pharmacopoeia 2020 edition: A review. *J Pharm Anal*. 2021;11(4):398–404. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.05>
16. Cirefice G, Schütte K, Spreitzer I, Charton E, Shaid S, Viviani L, et al. Rubbrecht. The future of pyrogenicity testing: Phasing out the rabbit pyrogen test. A meeting report, *Biologicals*. 2023;84:101702. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2023.101702>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *Е.О. Чечетова* – основная идея работы, сбор, анализ и систематизация литературных данных, набор текста, формулировка выводов; *Н.П. Неугодова* – критический пересмотр текста рукописи, консультация, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; *О.В. Шаповалова* – сбор литературных данных, обсуждение и редактирование текста рукописи.

Благодарности. Коллектив авторов благодарит А.А. Тутнову за ценные консультации и возможность практической работы.

Authors' contributions. All authors confirm that their authorship meets the ICMJE criteria. The most significant contributions were as is distributed as follows. *Ekaterina O. Chechetova* – the main idea of the work, collection, analysis and systematization of literary data, typesetting, formulation of conclusions. *Natalia P. Neugodova* – critical revision of the manuscript text and approval of the final version of the article for publication, consultation, approval of the final version of the article for publication. *Olga V. Shapovalova* – collection of literary data, discussion and editing of the manuscript.

Acknowledgements. The team of authors thanks Anna A. Tutnova for valuable consultations and the opportunity for practical work.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Чечетова Екатерина Олеговна / Ekaterina O. Chechetova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6728-594X>

Неугодова Наталия Петровна, канд. биол. наук / **Natalia P. Neugodova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>

Шаповалова Ольга Владимировна, канд. фарм. наук / **Olga V. Shapovalova**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0305-7769>

Поступила 01.04.2025

После доработки 19.05.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Received 1 April 2025

Revised 19 May 2025

Accepted 6 June 2025



О.В. Евдокимова 
А.С. Алексеева  

Новые виды лекарственного растительного сырья в российской фармакопее: номенклатура и требования к качеству (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*

✉ Алексеева Анастасия Сергеевна; AlekseevaAS@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Расширение номенклатуры лекарственного растительного сырья (ЛРС) и разработка стандартов его качества позволяют обеспечить российскую фармацевтическую промышленность новыми источниками биологически активных веществ для создания на их основе эффективных лекарственных препаратов с благоприятным профилем безопасности.

ЦЕЛЬ. Оценка изменений в номенклатуре и требованиях, предъявляемых к качеству ЛРС в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ).

ОБСУЖДЕНИЕ. ЛРС широко представлено как в зарубежных, так и в российской фармакопее. Количество фармакопейных статей (ФС) на новые виды ЛРС, а также актуализированных ФС, ранее включенных в Государственную фармакопею (ГФ РФ), растет. Так, в ГФ СССР X изд. входило 45 ФС на ЛРС, ГФ СССР XI изд. – 83 ФС, ГФ РФ XV изд. – 118. Начиная с ГФ РФ XIII изд. были актуализированы 106 ФС и включены 12 ФС на новые виды ЛРС. Для включения нового стандарта качества в ГФ РФ необходим всесторонний анализ ЛРС: от оценки сырьевой базы до доказательства терапевтической эффективности и безопасности лекарственных препаратов на его основе и методик контроля качества. Требования, предъявляемые к качеству ЛРС, претерпели изменения: для подтверждения подлинности и в количественном определении все чаще используется анализ биологически активных веществ, обладающих терапевтической активностью; качественные реакции преимущественно заменены инструментальными методами анализа, в первую очередь хроматографическими методами с использованием стандартных образцов действующих веществ или маркеров (активных или аналитических). Для некоторых видов ЛРС проводится идентификация примесей (в том числе недопустимых). Введены предельные нормы содержания токсичных веществ (тяжелые металлы, мышьяк, радионуклиды, остаточные пестициды).

ВЫВОДЫ. Включение в ГФ РФ новых видов ЛРС сопровождается значительным изменением требований к качеству и их актуализацией для видов ЛРС, ранее включенных в фармакопею. Контроль качества ЛРС с использованием новых показателей позволит обеспечить подлинность сырья и повысить безопасность его применения, что, в свою очередь, позволит расширить номенклатуру эффективных и безопасных лекарственных растительных препаратов.

Ключевые слова: государственная фармакопея; стандарты качества; фармакопейные статьи; лекарственное растительное сырье; лекарственные средства растительного происхождения; зарубежные фармакопеи

Для цитирования: Евдокимова О.В., Алексеева А.С. Новые виды лекарственного растительного сырья в российской фармакопее: номенклатура и требования к качеству (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(3):357–364. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-357-364>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200096-0).

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

Olga V. Evdokimova 
Anastasia S. Alekseeva 

New Species of Herbal Medicines in the Russian Pharmacopoeia: Nomenclature and Quality Requirements (Review)

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

✉ Anastasia S. Alekseeva; AlekseevaAS@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The expansion the nomenclature of herbal medicines and the development of standards for its quality allows us to provide the Russian pharmaceutical industry with new sources of biologically active substances for the creation of effective herbal medicine preparations based on them with a favorable safety profile.

AIM. Assessment of changes in the nomenclature and requirements for the quality of herbal medicines in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (Ph. Rus.).

DISCUSSION. Herbal drugs are widely represented in foreign and in our pharmacopoeias. The number of monographs for new species of herbal medicines, as well as updated monographs previously included in the State Pharmacopoeia is growing. If the Ph. USSR X includes 45 monographs for herbal medicines, XI edition – 83 monographs, whereas the Ph. Rus. XV already has 118 monographs. Starting with the Ph. Rus. 13th edition, 106 monographs have been updated and 12 monographs have been included for new species of herbal medicines. It is required a comprehensive analysis of herbal medicines, starting with an assessment of the source of raw materials and ending with proof of the therapeutic efficacy of herbal medicine preparations based on it, to include a new quality standard in the Ph. Rus. The requirements for the quality of herbal medicines have undergone changes: in qualitative and in quantitative determination, analysis of substances with therapeutic activity is more and more often used; qualitative reactions have been mainly replaced by chromatographic methods of analysis using standard samples of active substances or markers (active or analytical). For some species of herbal medicines impurities are identified (including unacceptable ones). Requirements with limits tests for the content of toxic substances (heavy metals and arsenic, radionuclides, residual pesticides) have been introduced.

CONCLUSIONS. The inclusion of new species of herbal medicines in Ph. Rus. is accompanied by a significant change in quality requirements and their updating for species of herbal medicines previously included in the pharmacopoeia. Quality control of herbal medicines using new indicators will ensure the authenticity of herbal medicines and increase the safety of their use, which in turn will expand the range of effective and safe herbal medicine preparations.

Keywords: State Pharmacopoeia of the Russian Federation; quality standards; general monographs; herbal medicines; herbal medicinal products; foreign pharmacopoeias

For citation: Evdokimova O.V., Alekseeva A.S. New species of herbal medicines in the Russian pharmacopoeia: nomenclature and quality requirements (review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(3):357–364. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-357-364>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00001-25-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 124022200096-0).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Российские фармакопеи всегда включали фармакопейные статьи (ФС), регламентирующие качество лекарственного растительного сырья (ЛРС). Наибольшее количество ФС на ЛРС и препаратов на его основе было представлено

в первой Российской фармакопее, опубликованной в 1866 г. на русском языке¹ (400 наименований). К середине прошлого столетия количество ФС, посвященных ЛРС, значительно снизилось (в Государственной фармакопее СССР X изд. содержалось только 45 наименований), что, вероятно,

¹ Русская Военная Фармакопея, изданная по Высочайшему повелению Военно-медицинским ученым комитетом. СПб.: Тип. Я. Троя; 1866.

было связано с быстрым ростом химической промышленности в целом [1]. К настоящему моменту интерес к растительным средствам вновь возрос и, несмотря на создание новых синтетических и биотехнологических препаратов, они востребованы. Это объясняется эффективностью лекарственных растительных препаратов (ЛРП), их относительной безопасностью, комплексным воздействием на органы и системы человеческого организма и ценовой доступностью² [2]. Доля ЛРП на российском фармацевтическом рынке на 2016 г. составляла около 20% [3], в 2020 г. доля ЛРП от всех аптечных продаж безрецептурных лекарственных средств составила 11,7% в натуральном и 8,4% в стоимостном выражении [4]. Однако констатировать насыщение потребности населения в препаратах растительного происхождения нельзя. Поэтому одной из актуальных задач современной фармацевтической науки является поиск новых растительных источников биологически активных веществ для создания на их основе лекарственных препаратов.

Ранее проводились исследования по расширению номенклатуры ЛРС для российской фармакопее, где были предложены критерии оценки перспективности включения новых видов в Государственную фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ). Основными из них являлись наличие монографии на ЛРС в Европейской фармакопее или монографии/ФС в трех и более зарубежных фармакопеях [5, 6]. Предлагалось также рассматривать как перспективные источники ЛРС для ГФ РФ сырье неофициальных видов растений, имеющих многолетнюю историю применения в традиционной медицине, и сырье, ранее включенное в отечественную фармакопею [7, 8].

Расширение номенклатуры лекарственного растительного сырья (ЛРС) и разработка стандартов его качества актуально, так как позволит обеспечить российскую фармацевтическую промышленность новыми источниками биологически активных веществ для создания на их основе эффективных и безопасных лекарственных препаратов.

Многие фармакопейные виды сырья, представленные в том числе в зарубежных фармакопеях, получают из культивируемых растений [8, 9].

Следовательно, существует необходимость возрождения и развития отрасли лекарственного растениеводства в Российской Федерации. В настоящее время межкомитетской рабочей группой Совета Федерации Федерального Собрания Российской Федерации по учету и анализу предложений курируются вопросы по восстановлению отрасли производства и переработки лекарственных и эфиромасличных культур в нашей стране, их стандартизации и контроля их качества³ [10, 11]. Разработка ФС на новые виды ЛРС для ГФ РФ является приоритетной задачей. Включение новых видов ЛРС открывает возможность для создания инновационных лекарственных препаратов на их основе.

Для включения ЛРС в фармакопею необходима его стандартизация. Требования к качеству ЛРС совершенствуются, и изучение их динамики позволит проводить стандартизацию сырья на надлежащем уровне для обеспечения эффективности и безопасности ЛРП.

Цель работы – выявление перспективных направлений расширения номенклатуры ЛРС путем оценки изменений номенклатуры и требований к качеству новых видов сырья в ГФ РФ.

Задачи исследования: анализ монографий зарубежных фармакопей и российских фармакопей X–XV изданий; обоснование целесообразности включения новых видов ЛРС в российскую фармакопею; оценка необходимости включения новых показателей качества ЛРС в фармакопею.

В работе использован информационно-аналитический метод исследования. Проанализированы следующие документы, определяющие номенклатуру и требования к качеству ЛРС: Государственная фармакопея СССР (далее – ГФ СССР) X и XI изд.; Государственная фармакопея Российской Федерации XIII–XV изд.; Европейская фармакопея (далее – Ph. Eur.); Фармакопея США (далее USP); Британская фармакопея; Фармакопея Республики Беларусь (далее – ГФ РБ); Фармакопея Китайской Народной Республики (КНР); Японская фармакопея; Фармакопея Индии; Государственная фармакопея Республики Казахстан⁴,

² Киселева ТЛ, Карпеев АА, ред. Гомеопатия и фитотерапия в лечении сердечно-сосудистых болезней. Т. 1. М.: Мосгорпечать; 1997.

³ <https://www.pnp.ru/social/matvienko-poruchila-podgotovit-otchet-o-sostoyanii-otrasli-lekarstvennykh-rasteniy.html>

⁴ Pharmacopée Française. X ed. AFS-SAPS, 1989-2005.

Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Vol. 1. Beijing: China Medical Science and Technology Press; 2015.

European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2025.

British Pharmacopoeia. V. 4. London; 2018.

Japanese Pharmacopoeia. 16th ed. Tokyo; 2006.

Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд. Т. 2. Молодечно: Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении; 2016.

United States Pharmacopoeia. USP41-NF36. Rockville; 2024.

Indian Pharmacopoeia. New Dehli: Ministry of Health and Family Welfare; 2010.

Государственная фармакопея Республики Казахстан. Астана: Жибек жолы; 2015.

а также Государственный реестр лекарственных средств⁵.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Значимость ЛРС для практической медицины можно оценить по числу ФС или монографий, включенных не только в отечественную, но и в зарубежные фармакопеи.

Рекордсменом по количеству монографий на ЛРС среди рассмотренных нами фармакопей является Французская фармакопея (554 вида ЛРС), а меньше всего монографий содержится в ГФ Республики Казахстан (30 видов ЛРС); в других фармакопейных документах содержатся: Фармакопея КНР – 463, Ph. Eur. – 255, Британская фармакопея – 249, Японская фармакопея – 162, ГФ РБ – 143, Фармакопея США – 67, Фармакопея Индии – 47 видов ЛРС.

В Российской Федерации количество ФС, включенных в фармакопейные документы, увеличивается начиная с ГФ СССР X изд.: ГФ СССР X изд. (1968 г.) – 45, ГФ СССР XI изд. (1987 г.) – 83, ГФ РФ XIII изд. (2015 г.) – 55, ГФ РФ XIV изд. (2018 г.) – 107, ГФ РФ XV изд. (2023 г.) – 118. Актуализированы стандарты качества на ЛРС из ГФ СССР XI изд., включенные в ГФ РФ XIII изд., а именно 51 ФС, в ГФ РФ XIV изд. – 52 ФС и в ГФ РФ XV изд. – 3 ФС. Кроме того, в ГФ РФ XIII изд. вошли 4 ФС на новые виды ЛРС, а в ГФ РФ XV изд. – 8 ФС. Таким образом, в период действия современных изданий фармакопей (ГФ РФ XIII–XV изд.) были актуализированы 106 ФС и включены 12 ФС на новые виды ЛРС.

Новые виды ЛРС в Государственной фармакопее Российской Федерации

В ГФ РФ XIII изд. вошли ФС на виды ЛРС, ранее не представленные ни в виде отдельных, ни в виде временных ФС: аронии черноплодной плоды, гинкго двулопастного листа, донника трава, тополя почки. Плоды аронии черноплодной в качестве сырья входят в зарегистрированный⁶ лекарственный препарат в лекарственной форме «эликсир» с группировочным названием «Аронии черноплодной плоды + Березы почки + Боярышника плоды + Боярышника цветки + Сосны кедровой сибирской орех + [Мед]».

Лекарственных средств на основе гинкго билоба листьев зарегистрировано несколько: это фармацевтическая субстанция с группировочным названием «Гинкго двулопастного листьев

экстракт сухой» и более 15 лекарственных препаратов, как монокомпонентных, содержащих в качестве активной фармацевтической субстанции только гинкго двулопастного листьев экстракт сухой, так и комплексных препаратов с гинкго двулопастного листьев экстрактом сухим в различных лекарственных формах: капсулы, раствор для приема внутрь, таблетки, покрытые пленочной оболочкой.

Донника трава входит в состав сбора с группировочным названием «Валерианы лекарственной корневища с корнями + Донника трава + Душицы обыкновенной трава + Пустырника трава + Чабреца трава», выпускаемого в пачках и фильтр-пакетах для приготовления водных извлечений.

Тополя почки были ранее включены в Государственной реестр лекарственных средств⁷ в качестве антисептического средства и рассматриваются как перспективный источник лекарственных средств [12, 13]. Некоторые из вышеперечисленных видов ЛРС включены в зарубежные фармакопеи (табл. 1). Так, монографии на сырье гинкго билоба представлены в 4, а донника – в 3 фармакопеях. Следует отметить, что ФС на аронии черноплодной плоды и тополя почки в зарубежных фармакопеях не представлены.

В ГФ РФ XV изд. включены 8 видов ЛРС, ранее не входивших в отечественную фармакопею: клевера трава, конского каштана обыкновенного семена, мальвы лесной цветки, облепихи крушиновидной плоды, первоцвета весеннего цветки, первоцвета корневища с корнями, подорожника ланцетного листа и сабельника болотного корневища с корнями. Аналогичные ФС и монографии за рубежом представлены на клевера траву (USP), конского каштана обыкновенного семена (Ph. Eur., Британская фармакопея, USP, ГФ РБ), мальвы лесной цветки (Ph. Eur., Британская фармакопея), первоцвета корневища с корнями (Ph. Eur., Британская фармакопея, ГФ РБ), подорожника ланцетного листа (Ph. Eur., Британская фармакопея, ГФ РБ) и сабельника болотного корневища с корнями (ГФ РБ) (табл. 1).

Новые виды ЛРС ГФ РФ востребованы для лечения многих заболеваний⁸. На основе экстракта жидкого из клевера травы на российском фармацевтическом рынке представлен лекарственный препарат, обладающий гиполипидемическим действием. Препараты из семян конского

⁵ <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>

⁶ Там же.

⁷ Государственный реестр лекарственных средств. Том I. М. 2008. с. 408, 469.

⁸ <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>

Таблица 1. Виды лекарственного растительного сырья (ЛРС), впервые включенного в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII и XV изданий**Table 1.** Species of herbal medicines, first included in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII and XV editions, and their availability in foreign pharmacopoeias

Название ЛРС	Наличие ЛРС в зарубежных фармакопеях			
	Европейская фармакопея	Британская фармакопея	Фармакопея США	Государственная фармакопея Республики Беларусь
Аронии черноплодной сухие плоды <i>Aroniae melanocarpae sicco fructus</i>	отсутствует			
Гинкго двулопастного листа <i>Ginkgo biloba folia</i>	присутствует			
Донника трава <i>Meliloti herba</i>	присутствует		отсутствует	присутствует
Тополя почки <i>Populi gemmae</i>	отсутствует			
Клевера трава <i>Trifolii herba</i>	отсутствует		присутствует	отсутствует
Конского каштана обыкновенного семена <i>Aesculi hippocastani semina</i>	присутствует			
Мальвы лесной цветки <i>Malvae sylvestris flores</i>	присутствует		отсутствует	
Облепихи крушиновидной плоды <i>Hippophaes rhamnoides fructus</i>	отсутствует			
Первоцвета весеннего цветки <i>Primulae veris flores</i>	отсутствует			
Первоцвета корневища с корнями <i>Primulae rhizomata cum radicibus</i>	присутствует		отсутствует	присутствует
Подорожника ланцетного листа <i>Plantaginis lanceolatae folia</i>	присутствует		отсутствует	присутствует
Сабельника болотного корневища с корнями <i>Comari palustris rhizomata cum radicibus</i>	отсутствует			присутствует

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

каштана обыкновенного (как однокомпонентные, так и комплексные) показаны в качестве средств, повышающих способность капилляров сохранять целостность и способствующих улучшению микроциркуляции крови. Они применяются для облегчения боли и симптомов «усталости ног», уменьшения отека ног. Экстракты мальвы лесной цветков и подорожника ланцетного листьев входят в более чем 5 лекарственных препаратов в лекарственной форме «сироп», производящихся как в России, так и в других странах и применяющихся при кашле и простудных заболеваниях как отхаркивающие средства.

В комплексном лечении острых и хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, сопровождающихся кашлем и образованием мокроты (трахеит, трахеобронхит, бронхит), используются препараты с экстрактами (сухими и жидкими) первоцвета корневищ с корнями.

Первоцвета весеннего цветки в виде измельченного сырья или экстракта сухого входят в состав препаратов для лечения простудных заболеваний. В комплексной терапии воспалительных и дегенеративных заболеваний опорно-двигательного аппарата, в том числе артритов, артрозов, применяется препарат на основе сабельника болотного корневищ с корнями. Облепихи крушиновидной плоды используются для получения масла жирного растительного, которое входит в состав препаратов в различных лекарственных формах: суппозитории ректальные, капсулы, аэрозоли для наружного применения, мазь для местного применения, масло для приема внутрь, местного и наружного применения. Препараты, содержащие масло из облепихи крушиновидной плодов, оказывают противовоспалительное и антиоксидантное действие и используются для стимуляции репаративных процессов в коже и слизистых оболочках,

для ускорения заживления поврежденных тканей. Монографии на облепихи крушиновидной плоды и первоцвета весеннего цветки в зарубежных фармакопеях отсутствуют.

Таким образом, в ГФ РФ включены новые ФС на ЛРС, представленное в зарубежных фармакопеях, лекарственные препараты на основе которого применяются в отечественной медицинской практике, а также ЛРС, использующиеся только в российской медицине. Разработка ФС на ЛРС продолжается: уже после выхода ГФ РФ XV изд. актуализированы и разработаны ФС более чем на 40 видов ЛРС, которые находятся на разных стадиях утверждения⁹.

Требования, предъявляемые к контролю качества ЛРС в Государственной фармакопее Российской Федерации

Необходимым условием для включения нового стандарта качества в ГФ РФ является всесторонний анализ ЛРС начиная с оценки сырьевой базы и заканчивая доказательством терапевтической эффективности и безопасности лекарственных препаратов на его основе. Требования, предъявляемые к контролю качества ЛРС, в настоящее время претерпели значительные изменения [14]. Если оценивать структуру ФС на ЛРС в ГФ СССР XI изд., то она состояла из разделов: «Введение», «Внешние признаки», «Микроскопия», «Качественные реакции», «Числовые показатели», «Количественное определение», «Упаковка», «Срок годности» и «Фармакологическая группа». Следует отметить, что не во всех ФС присутствовали разделы «Качественные реакции» и «Количественное определение».

Применение качественных (общих) реакций на биологически активные вещества не позволяет однозначно идентифицировать ЛРС, содержащие такие группы веществ, как: антраценпроизводные соединения (крушины ольховидной кора, сенны листья, жостера слабительного плоды, ревеня дланевидного корни), дубильные вещества (дуба кора, калины обыкновенной кора, брусники обыкновенной листья, толокнянки обыкновенной листья, ольхи соплодия, черники обыкновенной плоды, бада на толстолистного корневища, змеевика корневища), полифенольные соединения (брусники обыкновенной листья, толокнянки обыкновенной листья), флавоноиды (бессмертника песчаного цветки, липы цветки, зверобоя трава, горца перечного трава, горца птичьего трава), изофлавоноиды (стальника полевого корни), антоцианы

(черники обыкновенной плоды), полисахариды (подорожника большого листья, ламинарии слоевища), слизи (алтея корни), инулин (одуванчика лекарственного корни, девясила высокого корневища и корни), сапонины (синюхи голубой корневища с корнями). Раздел «Качественные реакции» встречается менее чем в 30% ФС в ГФ СССР XI изд.

Помимо качественных реакций для небольшой доли ЛРС (около 10% видов) использовались специфические физико-химические методы анализа: тонкослойная хроматография (ТСХ) (хвоща полевого трава, калины обыкновенной кора, боярышника цветки, боярышника плоды, крапивы двудомной листья, аралии маньчжурской корни, женьшеня настоящего корни, родиолы розовой корневища и корни) и бумажная хроматография (череды трехраздельной трава).

Для количественной оценки биологически активных веществ часто использовались неспецифические методы анализа или же проводилось определение суммарного содержания веществ без подтверждения количества действующих веществ, как, например, при определении экстрактивных веществ, которые определяют все вещества, извлекаемые конкретным экстрагентом, и не оценивают содержание веществ, обеспечивающих терапевтическую эффективность лекарственных препаратов на основе растительного сырья.

В настоящее время для идентификации ЛРС используются как качественные реакции, так и новые показатели качества (ТСХ). Как и ранее, в ФС приводятся макроскопическое описание сырья и описание анатомо-диагностических признаков. Особенностью ГФ РФ является иллюстрирование диагностических признаков преимущественно с помощью фотографий и редко – рисунков. Качественные реакции в большинстве случаев заменены физико-химическими методами анализа, например ТСХ (в действующей фармакопее встречается практически во всех ФС как на свежее, так и на высушенное ЛРС). Этот метод относят к специфическим, так как предусматривается использование стандартных образцов биологически активных веществ или веществ-маркеров. Маркеры делят на 2 категории: активные маркеры – компоненты или группы компонентов, которые, как правило, вносят вклад в терапевтическую активность (например, антраценпроизводные соединения в ФС на крушины ольховидной кору и в ФС на сенны листья) и аналитические маркеры – компоненты

⁹ <https://www.pharmacopoeia.regmed.ru>

или группы компонентов, которые служат исключительно для аналитических целей (например, Судан красный G в ФС на эвкалипта прутовидного листа или Судан III в ФС на тысячелистника обыкновенного траву¹⁰).

Для количественного определения действующих веществ, определяющих терапевтическое действие, применяются как использованные ранее химические и физико-химические методы анализа (титриметрия, спектроскопия), так и более современные специфические методы, например высокоэффективная жидкостная хроматография (валерианы лекарственной корневища с корнями, шиповника плоды, элеутерококка корневища и корни, донника трава). И если ранее в ГФ СССР XI изд. раздел «Количественное определение» в некоторых ФС отсутствовал, то в настоящее время он присутствует практически во всех статьях. При отсутствии возможности использования какого-либо из указанных выше методов для количественной оценки биологически активных веществ могут быть включены другие показатели: например, коэффициент набухания характеризует сырье, содержащее слизи (мальвы лесной цветки). Очень редко такой показатель может не быть включен в ФС (например, первоцвета корневища с корнями). В монографиях зарубежных фармакопей, в которые включены эти виды сырья, раздел «Количественное определение» также отсутствует, но, несмотря на это, включение этого раздела является важной задачей и перспективным направлением для будущих исследований.

Для ЛРС также были введены новые показатели:

- идентификация сырья близкородственных видов растений: предусматривается возможность обнаружения недопустимых примесей в ЛРС по внешним признакам (хвоща полевого трава, череды трехраздельной трава), анатомо-диагностическим признакам (хвоща полевого трава, чага) и хроматографическим характеристикам (хвоща полевого трава, подорожника ланцетного листа, первоцвета корневища с корнями, крушины ольховидной кора, череды трехраздельной трава) [7, 15];
- токсичные вещества: тяжелые металлы и мышьяк, позволяющие оценить и нормировать допустимые пределы содержания отдельных элементарных примесей (ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка

в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»); радионуклиды (ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»);

- из-за особенностей культивирования ЛРС необходимы доказательства отсутствия или определение допустимого содержания остаточного количества пестицидов (ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»).

Необходимо отметить, что качество ЛРС во многом определяет эффективность и безопасность тех фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов, которые из него получают, поэтому выбор корректных подходов к определению показателей качества и использование современных методов анализа имеет первостепенное значение [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало положительную динамику развития российской фармакопии в области расширения номенклатуры ЛРС и его стандартизации. Расширение номенклатуры ЛРС осуществляется с учетом востребованности ЛРП для лечения распространенных заболеваний, а также с использованием зарубежного опыта разработки стандартов качества на ЛРС. Такой комплексный подход и далее позволит расширять номенклатуру ЛРС, эффективных и безопасных лекарственных средств на их основе.

Современные стандарты качества как на новые виды ЛРС, так и на сырье, ранее включенное в фармакопее, претерпели значительные изменения: используются современные физико-химические методы анализа, позволяющие определять биологически активные вещества с терапевтической активностью; включены показатели с предельными нормами содержания токсичных веществ (тяжелые металлы и мышьяк, радионуклиды, остаточные пестициды), обеспечивающие снижение вероятности фальсификации и повышение эффективности и безопасности лекарственных препаратов растительного происхождения. Такие изменения в ФС на ЛРС обеспечивают гармонизацию требования качества на ЛРС с зарубежными фармакопеями.

¹⁰ Guideline on quality of combination herbal medicinal products / traditional herbal medicinal products. EMEA/HMPC/CHMP/CVMP/214869/2006. EMA; 2008.

Рекомендации Коллегии ЕЭК от 10.05.2018 № 6 «О Руководстве по качеству лекарственных растительных препаратов»; от 25.05.2021 № 8 «О Руководстве по оценке качества лекарственных препаратов на основе комбинаций лекарственного растительного сырья и (или) растительных фармацевтических субстанций (препаратов на основе лекарственного растительного сырья)».

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Мирошниченко ЮВ, Саканян ЕИ, Кононов ВН, Перфильев АБ. История создания российских военных фармакопей. *Фармация*. 2016;65(5):14–8. Miroshnichenko YuV, Sakanyan EI, Kononov VN, Perfiliev AB History of Russian military pharmacopoeias. *Pharmacy*. 2016;65(5):14–8 (In Russ.). EDN: [WHNFDJ](https://doi.org/10.30895/2312-7821-2020-8-4-165-177)
2. Демидова ОА, Архипов ВВ, Журавлева МВ, Александрова ТВ, Александров АА. Безопасность лекарственных растительных препаратов: клинико-фармакологические аспекты. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2020;8(4):165–77. Demidova OA, Arkhipov VV, Zhuravleva MV, Alexandrova TA, Alexandrov AA. Safety of herbal medicines: clinical and pharmacological aspects. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2020;8(4):165–77 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2020-8-4-165-177>
3. Акамова АВ, Немытых ОД, Наркевич ИА. Многовекторный маркетинговый анализ российского рынка фитопрепаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(4):276–80. Akamova AV, Nemyatykh OD, Narkevich IA. Multiple view marketing analysis of the Russian plant-based drugs market. *Drug Development & Registration*. 2017;(4):276–80 (In Russ.). EDN: [ZTWVKH](https://doi.org/10.21518/1561-5936-2021-3-11-22)
4. Сафонова НВ, Трофимова ЕО. Обзор российского рынка растительных препаратов. *Ремедиум*. 2021;(3):11–22. Safonova NV, Trofimova EO. Overview of the Russian market of herbal products. *Remedium*. 2021;(3):11–22 (In Russ.). <https://doi.org/10.21518/1561-5936-2021-3-11-22>
5. Смирнова ЮА, Киселева ТЛ. Новые виды лекарственных растений для отечественной фармакопеи. *Фармация*. 2009;(7):6–8. Smirnova YuA, Kiseleva TL. New species of medical plants for Russian pharmacopoeia. *Pharmacy*. 2009;(7):6–8 (In Russ.). EDN: [KZMPON](https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-1-29-40)
6. Киселева ТЛ, Смирнова ЮА. *Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества*. М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов; 2009. Kiseleva TL, Smirnova YuA. *Medicinal plants in the world medical practice: State regulation range and quality*. Moscow: Professional Association of Naturopaths; 2009 (In Russ.). EDN: [OLVFFL](https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-1-29-40)
7. Фролова ЛН, Ковалева ЕЛ, Саканян ЕИ, Кутейников ВЮ, Шелестова ВВ, Черемисина МА. Сравнительный анализ номенклатуры лекарственного растительного сырья, используемого в отечественной и мировой фармакопейной практике. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(1):29–40. Frolova LN, Kovaleva EL, Sakanyan EI, Kuteynikov VYu, Shelestova VV, Cheremisina MA. Comparison of the nomenclatures of herbal substances used in the Russian and foreign pharmacopoeial texts. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(1):29–40 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-1-29-40>
8. Новиков ОО, Саканян ЕИ, Писарев ДИ, Жилиякова ЕТ, Саканян КМ, Новикова МЮ и др. Современные вопросы фармакогнозии: возвращение «забытых» лекарственных растений. *Медицинский оппонент*. 2022;(1):44–51. Novikov OO, Sakanyan EI, Pisarev DI, Zhilyakova ET, Sakanyan KM, Novikova MY, et al. Modern issues of pharmacognosy: the return of “forgotten” medicinal plants. *Medical Opponent*. 2022;(1):44–51. EDN: [XJHWPK](https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-2-142-148)
9. Козко АА, Цицилин АН. Перспективы и проблемы возрождения лекарственного растениеводства в России. *Биология растений и садоводство: теория, инновации*. 2018;(146):18–25. Kozko AA, Tsitsilin AN. Prospects and problems of revival of medicinal crop production in Russia. *Plant Biology and Horticulture: Theory, Innovation*. 2018;(146):18–25 (In Russ.). https://doi.org/10.25684/NBG_scbbook.146.2018.03
10. Яруткин АВ, Багирова ВЛ. Государственная фармакопея XV издания: приоритетные направления развития. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(5):572–9. Yarutkin AV, Bagirova VL. State Pharmacopoeia of the Russian Federation edition XV: development priorities. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(5):572–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-5-572-579>
11. Сидельников НИ. Актуальные направления изучения перспективных видов лекарственных растений. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(2):128–31. Sidelnikov NI. Current trends in the study of promising medicinal plant species. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(2):128–31 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-2-128-131>
12. Браславский ВБ. Тополь и прополис – перспективные источники лекарственных средств. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Специальный выпуск «XII конгресс «Экология и здоровье человека»*. 2007;2:152–5. Braslavsky VB. Poplar and propolis – promising sources of medicinal products. *News of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. Special issue of the XII Congress “Ecology and Human Health”*. 2007;2:152–5 (In Russ.).
13. Браславский ВБ, Куркин ВА, Мизина ПГ. Перспективы использования фитопрепаратов на основе видов рода *Populus* L. и прополиса. *II Российский фитотерапевтический съезд: сборник научных трудов съезда. Приложение к журналу «Традиционная медицина»*. 2010;(3):97–103. Braslavsky VB, Kurkin VA, Mizina PG. Prospects for the use of herbal preparations based on species of the genus *Populus* L. and propolis. *II Russian Phytotherapeutic Congress: collection of scientific papers of the congress. Supplement to the journal “Traditional Medicine”*. 2010;(3):97–103 (In Russ.).
14. Саканян ЕИ, Ковалева ЕЛ, Фролова ЛН, Шелестова ВВ. Современные требования к качеству лекарственных средств растительного происхождения. *Ведомости Научного Центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(3):170–8. Sakanyan EI, Kovaleva EL, Frolova LN, Shelestova VV. Current requirements for the quality of herbal medicinal products. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(3):170–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-170-178>
15. Евдокимова ОВ, Лякина МН, Бекетова АВ, Лядыгина ЛА, Штетинина АП. Гармонизация фармакопейных требований при определении близкородственных видов в лекарственных средствах растительного происхождения. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(2):142–8. Evdokimova OV, Lyakina MN, Beketova AV, Ladygina LA, Shchetinina AP. Harmonisation of pharmacopoeial requirements for identification of closely related species in herbal medicinal products. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(2):142–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-2-142-148>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: О.В. Евдокимова – разработка концепции работы, написание текста рукописи, формулировка выводов; А.С. Алексеева – анализ и поиск источников литературы, написание фрагментов текста работы, редактирование текста.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Olga V. Evdokimova – elaboration of the study concept, writing of the text. Anastasia S. Alekseeva – analysis and search of literature sources, writing text fragments; editing of the text.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

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

Алексеева Анастасия Сергеевна, канд. фарм. наук / Anastasia S. Alekseeva, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6094-8990>

Поступила 23.04.2025

После доработки 13.05.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Received 23 April 2025

Revised 13 May 2025

Accepted 6 June 2025



Услуги ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



ФАРМАКОПЕЙНЫЕ СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ



ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ



ВВОД В ГРАЖДАНСКИЙ ОБОРОТ



ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ МЕРОПРИЯТИЯ



ЭКСПЕРТНАЯ НАУЧНАЯ ПОМОЩЬ



МЕЖЛАБОРАТОРНЫЕ СЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ



ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ РАСЧЕТ ОБРАЗЦОВ



ТРАНСФЕР МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ



ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

Приглашаем к сотрудничеству всех заинтересованных представителей фармацевтического сообщества

**Регуляторные исследования
и экспертиза лекарственных средств**

