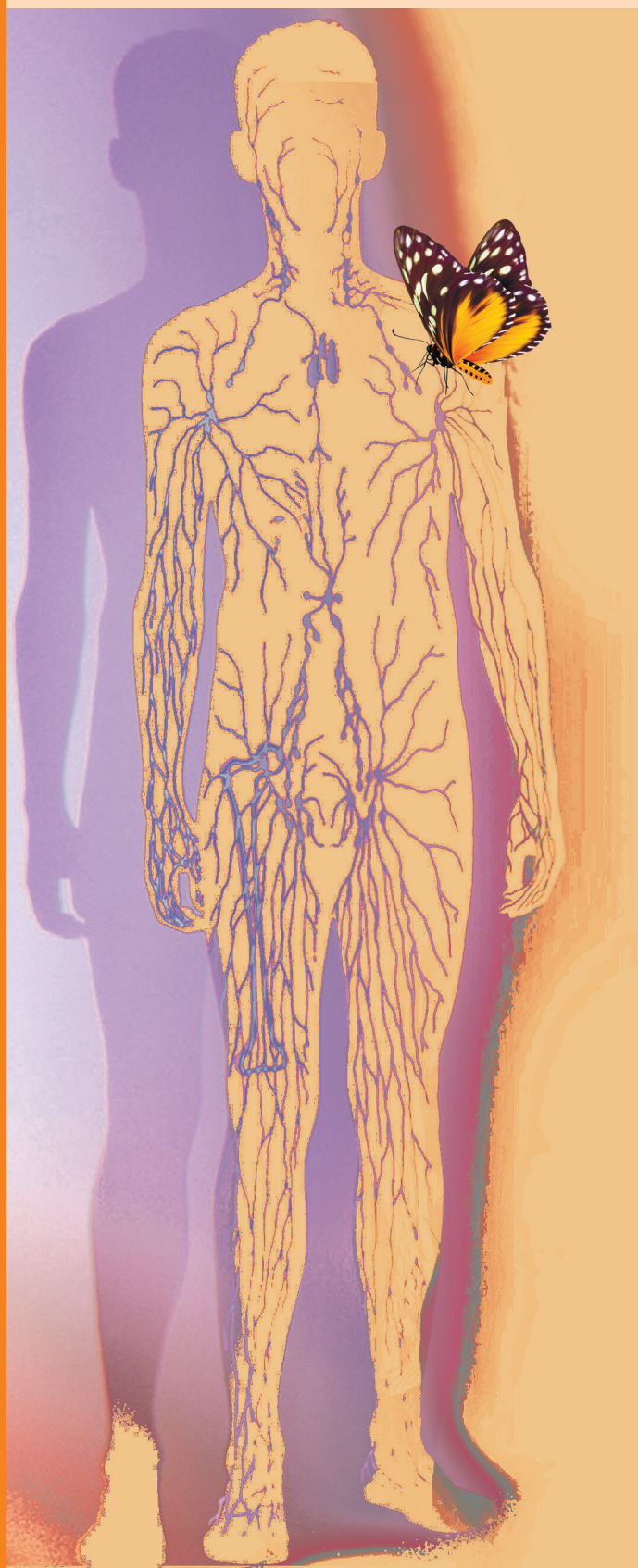


ФАРМАКО КИНЕТИКА *и* ДИНАМИКА



№ 3.2019



Издательство

ОКИ

Главный редактор

Жердев Владимир Павлович

д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, Москва

Зам. главного редактора

Фирсов Александр Алексеевич

член-корр. РАН, д.б.н., профессор, Москва

Ответственный секретарь

Литвин Александр Алексеевич

д.б.н., Москва

Редакционная коллегия

**Белоплицкая
Вера Геннадиевна**
к.б.н., Москва

**Бондарева
Ирина Борисовна**
д.б.н., Москва

**Воронина
Татьяна Александровна**
заслуженный деятель науки
РФ, д.м.н., профессор, Москва

Громова Ольга Алексеевна
д.м.н., профессор, Москва

Дурнев Андрей Дмитриевич
член-корр. РАН, д.м.н.,
профессор, Москва

Казей Василий Игоревич
к.б.н., Москва

Ковалёв Георгий Иванович
д.м.н., профессор, Москва

**Колыванов Геннадий
Борисович**, д.б.н., Москва

Мирзоян Рубен Симонович
заслуженный деятель науки
РФ, д.м.н., профессор, Москва

**Раменская
Галина Владиславовна**
д.ф.н., профессор, Москва

**Сариев Абрек
Куангалиевич**
д.м.н., профессор, Москва

Спасов Александр Алексеевич
академик РАН, д.м.н.,
профессор, Волгоград

**Смирнов Валерий
Валерьевич**, к.ф.н., Москва

**Стародубцев
Алексей Константинович**
д.м.н., профессор, Москва

Сычёв Дмитрий Александрович
член-корр. РАН, д.м.н.,
профессор, Москва

Тюрников Иван Николаевич
член-корр. РАН, д.м.н.,
профессор, Волгоград

Чистяков Виктор Владимирович
д.ф.н., профессор, Москва

Выпускающая группа

**Белоусов
Дмитрий Юрьевич**
Ответственный за выпуск
журнала
+ 7 (910) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

**Афанасьева
Елена Владимировна**
Генеральный директор
ООО «Издательство ОКИ»
подписка
+ 7 (916) 986-04-65
e-mail: eva88@list.ru
сайт: www.izdat-oki.ru

Жук Елена Владимировна
Дизайн и верстка
e-mail: elenazuk70@mail.ru

Подписано в печать 01.11.2019 г. Тираж 400 экз.
Типография: ООО «Буки Веди», www.bukivedi.com

115093, г. Москва, Партийный переулок, д. 1, корп. 58, стр. 3, пом. 11

Адрес редакции: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8 ФГБНУ «НИИ фармакологии
имени В.В. Закусова» РАН Тел./Факс: + 7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Журнал «Фармакокинетика и Фармакодинамика» является приложением к журналу «Ка-
чественная клиническая практика». Журнал «Качественная клиническая практика» заре-
гистрирован Комитетом РФ по печати 28.05.2001 г. Свидетельство о регистрации средства
массовой информации ПИ № 77-9142. Авторские материалы не обязательно отражают
точку зрения редакции. Редакция не несет ответственности за достоверность информации,
содержащейся в рекламных материалах.

Сайты

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru
www.ClinVest.ru
www.Hospital-Apteka.ru
www.PharmacoGenetics-Pharmacogenomics.ru

Журналы

Антибиотики и Химиотерапия
Качественная клиническая практика
Дайджест «Больничная аптека»
Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru
www.Market-Access-Solutions.ru
www.izdat-oki.ru

Центр Фармакоэкономических Исследований
Market Access Solutions
Издательство ОКИ

ОБЗОРЫ

Статистическая обработка качественных (категориальных)
данных в фармакологических исследованиях
Цорин И.Б. 3

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Синтез цикло-L-пролилглицина и изучение его
антипаркинсонической активности
Колясникова К.Н., Голубятникова А.К., Ребеко А.Г.,
Вуколова М.Н., Поварнина П.Ю., Кузнецова Е.А. 19

Влияние пептидного анксиолитика селанка
на когнитивные нарушения, индуцированные алкоголем,
у молодых крыс
Надорова А.В., Чернякова И.В., Колик Л.Г. 27

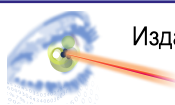
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

Сравнительная фармакокинетика и фармакодинамика
ноопепта, его активного метаболита циклопролилглицина
и пирацетама
Бойко С.С., Колясникова К.Н., Жердев В.П. 34

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

Биосимиляр двухфазного инсулина человека: результаты
двойного слепого, рандомизированного, сравнительного,
перекрестного клинического
исследования фармакокинетики
Каронова Т.Л., Майоров А.Ю., Макаренко И.Е.,
Кокшарова Е.О., Авдеева О.И., Андреева А.Т.,
Драй Р.В. 39

Результаты двойного слепого, рандомизированного,
сравнительного, перекрестного исследования
фармакокинетики и фармакодинамики препаратов
генно-инженерного инсулина человека
Майоров А.Ю., Авдеева О.И., Кокшарова Е.О.,
Беликова Т.М., Мишина Е.Е., Драй Р.В. 47



Издательство

ОКИ

Chief editor

Zherdev Vladimir

Ph.D., Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Moscow

Deputy chief editor

Firsov Alexander

Corresponding Member RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Executive secretary

Litvin Alexander

Ph.D., Moscow

Editorial Board

Belolipetskaia Vera

Ph.D., Moscow

Bondareva Irina

Ph.D., Moscow

Voronina Tatiana

Honored Scientist RF, Ph.D.,
Professor, Moscow

Gromova Olga

Ph.D., Professor, Ivanovo

Durnev Andrey

Corresponding Member RAS,
Ph.D., Professor, Moscow

Kazey Vasily

Ph.D., Professor, Moscow

Kovalev Georgy

Ph.D., Professor, Moscow

Kolyanov Gennady

Ph.D., Moscow

Mirzoyan Ruben

Honored Scientist RF, Ph.D.,
Professor, Moscow

Ramenskaya Galina

Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek

Ph.D., Professor, Moscow

Spasov Alexander

RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Smirnov Valery

Ph.D., Moscow

Starodubtcev Alex

Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry

Corresponding Member RAS,
Ph.D., Professor, Moscow

Tyurenkov Ivan

Corresponding Member PAS,
Ph.D., Professor, Volgograd

Chistyakov Viktor

Ph.D., Professor, Moscow

Graduate group

Belousov Dmitry

Responsible for this issue
+7 (910) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

Afanasyeva Elena

CEO in LLC «Publishing OKI»
subscription
+7(916)986-04-65
e-mail: eva88@list.ru
site:www.izdat-ok.ru

Zhuk Elena

Design and layout
e-mail: elenazuk70@mail.ru

Signed in print 01.11.2019 r. **Circulation** 400 copies.

Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com

115093, Moscow, Partynyj pereulok, 1/58, bld. 3, office 11

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiskaya, 8

FSBI «ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY»

Tel./Fax: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Journal «Pharmacokinetics and Pharmacodynamics» is a supplement to the journal «Good Clinical Practice». Journal «Good Clinical Practice» registered by Russian Committee for Press 28.05.2001 Certificate of registration of mass media PI №77-9142. Copying material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

Sites

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru

www.ClinVest.ru

www.Hospital-Apteka.ru

www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Journals

Antibiotics and Chemotherapy

Good Clinical Practice

Digest «Hospital pharmacy»

Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

www.HealthEconomics.ru

www.Market-Access-Solutions.ru

www.izdat-Ok.ru

Center of Pharmacoeconomics Research

Market Access Solutions

Publisher OKI

REVIEWS

Statistical processing of qualitative (nominal) data
in pharmacological research

Tsorin IB 3

PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

Synthesis of cyclo-L-prolyl-glycine and study
of its anti-parkinsonian activity

*Koliasnikova KN, Golubyatnikova AK, Rebeko AG,
Vukolova MN, Povarnina PYu, Kuznetsova EA* 19

The effect of peptide anxiolytic selank on cognitive impairment
induced by acute alcohol in adolescent rats

Nadorova AV, Chernyakova IV, Kolik LG 27

EXPERIMENTAL PHARMACOKINETICS

Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics
of noopept, its activity metabolite cyclopropylglycine and
piracetam

Boyko SS, Kolyasnikova KN, Zherdev VP 34

CLINICAL PHARMACOKINETICS

TBiosimilar of biphasic human insulin: results of a double-blind,
randomized, comparative, cross-sectional clinical study
of pharmacokinetics

*Karonova TL, Mayorov AYu, Makarenko IE, Koksharova EO,
Avdeeva OI, Andreeva AT, Dray RV* 39

Results of a double-blind, randomized, comparative,
cross-sectional study of the pharmacokinetics
and pharmacodynamics of genetically engineered
human insulin preparations

*Mayorov AYu, Avdeeva OI, Koksharova EO,
Belikova TM, Mishina EE, Dray RV* 47

Статистическая обработка качественных (категориальных) данных в фармакологических исследованиях

Цорин И. Б.

Лаборатория фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. В статье рассматриваются описательная (дескриптивная) статистика данных, измеренных в качественных (категориальных) шкалах, и критерии для определения статистической значимости различий между выборками. Особое внимание уделяется проблеме множественных сравнений такого рода данных. Для каждого метода приводятся примеры обработки данных, получаемых в фармакологических исследованиях.

Ключевые слова: категориальные шкалы; фармакологические исследования; множественные сравнения; дескриптивная статистика

Для цитирования:

Цорин И.Б. Статистическая обработка качественных (категориальных) данных в фармакологических исследованиях // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 3. – С.3–18. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10050

Statistical processing of qualitative (nominal) data in pharmacological research

Tsorin IB

FSBI «Zacusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. The article deals with descriptive statistics of data measured using qualitative (categorical) scales and criteria for determining the statistical significance of differences between samples. Special attention is paid to the problem of multiple comparisons of data measured using nominal scales. For each method, examples of data processing obtained in pharmacological studies are given.

Keywords: heart electrical field; atrium; alcoholic cardiomyopathy; white outbred rats

For citations:

Tsorin IB. Statistical processing of qualitative (nominal) data in pharmacological research. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;3:3–18. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10050

При проведении фармакологических исследований достаточно часто данные измеряют в качественных шкалах, среди которых выделяют два типа: порядковые (ординальные) и категориальные или номинальные. В порядковых шкалах измерения производятся в баллах или в уровнях интенсивности процесса (лёгкая форма заболевания, средней тяжести, тяжёлая). Категориальные (номинальные) шкалы дают ответ о принадлежности объекта к той или иной категории: «есть реакция»/«нет реакции», пол – мужской/женский, глаза – голубые/карие/чёрные и т. д. Однако исследователи, проводя статистическую обработку категориальных данных, часто не учитывают ограничения, которые имеет тот или иной статистический критерий. При этом ошибки допускаются уже в числовом описании полученных результатов. Именно описанию и обработке данных, регистрируемых в категориальных (номинальных) шкалах, и посвящена настоящая работа.

Описательная (дескриптивная) статистика

Как уже указано выше, используя номинальную шкалу, определяют принадлежность объекта к тому или иному классу. Номинальные шкалы бывают дихотомическими (биномиальными, альтернативными), когда имеется только две градации ответа (выжил/умер, самец/самка и т. д.), и полиномиальными, когда градаций ответа больше двух (например, глаза

голубые, зелёные, карие). В этих шкалах можно посчитать количество объектов в классах – абсолютные и относительные частоты. (Абсолютные частоты (m_i) – числа, показывающие, сколько раз отдельные варианты встречаются в данной выборке, относительные частоты или частности или веса (w_i) – отношение абсолютной частоты к общему объёму выборки). Никакие другие математические операции с номинальными данными невозможны [1].

Для дихотомической шкалы формула вычисления относительной частоты выглядит следующим образом

$$w = \bar{p} = \frac{m}{n}, \quad (1)$$

где m – абсолютная частота;

n – объём выборки.

Относительная частота вариантов, не обладающих изучаемым признаком, обозначается буквой q и выражается соотношением $\bar{q} = (n - m) / n = 1 - \bar{p}$.

Иногда относительную частоту выражают в процентах, тогда вышеприведённая формула приобретает следующий вид.

$$\bar{p} = \frac{m}{n} 100 \%. \quad (2)$$

Согласно теореме Бернулли относительная частота события ($\bar{p}$) с увеличением n стремится к вероятности осуществления события в одном испытании (p) и является абсолютно корректной оценкой этой вероятности [1–3].

Если дихотомический признак наблюдается в 0 или 100 % случаев, то при относительно небольшой выборке ($n < 1000$) такой результат чаще всего связан с чисто случайными вариациями. В таких случаях при расчёте относительной частоты в формулу следует внести поправку [2]:

$$\bar{p} = \frac{m+1}{n+2}, \quad (3)$$

или

$$\bar{p} = \frac{m+1}{n+2} \cdot 100 \%. \quad (4)$$

Исследователи фармакологи при описании данных, измеренных в номинальных шкалах, часто выражают полученные результаты в процентах. Однако следует помнить, что, работая с небольшими выборками ($n \leq 20$), необходимо пользоваться абсолютными частотами или указывать и те, и другие показатели [4]. Используя относительные частоты, исследователи от дискретной переменной переходят к непрерывной, что в случае малых выборок может привести к ошибке в интерпретации. Эти ошибки связаны с тем, что при малых выборках доверительные интервалы относительных частот в выборках, имеющих распределение близкое к биномиальному (именно такое распределение наблюдается обычно в фармакологических исследованиях), очень велики. Необходимо также отметить, что при $n \leq 100$, проценты следует вычислять с точностью до целых, при объёме выборки более 100 — до десятых [4].

Полиномиальные шкалы и действия с ними мы рассматривать не будем, так как в экспериментальной фармакологии они практически не применяются.

Помимо статистики, характеризующей математическое ожидание генеральной совокупности, желательнее определять показатели вариации признака.

В случае измерения признака с помощью дихотомической шкалы в качестве характеристик варьирования служат выборочные стандартные (средние квадратичные) отклонения частот s_m и s_p , которые определяют по следующим формулам:

для абсолютных частот

$$s_m = \sqrt{\frac{m(n-m)}{n}}, \quad (5)$$

для относительных частот

$$s_p = \sqrt{\bar{p}(1-\bar{p})} = \sqrt{\bar{p}\bar{q}}, \quad (6)$$

если частоты альтернативных вариантов выражены в процентах

$$s_p = \sqrt{\bar{p}(100-\bar{p})}, \quad (7)$$

Эти статистики одинаково характеризуют варьирование обеих альтернативных групп [3].

Так как относительная частота является выборочной приближённой оценкой вероятности единичного

события, то для этой статистики может быть рассчитана стандартная ошибка [3]:

$$s_{\bar{p}} = \frac{s_p}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\bar{p}\bar{q}}{n}}, \quad (8)$$

В том случае, когда относительная частота события равна 0 или 1, $s_{\bar{p}}$ рассчитывают с помощью скорректированной формулы [2].

$$s_{\bar{p}} = \sqrt{\frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{n+3}}, \quad (9)$$

где $\bar{p}$ — скорректированная, как описано выше (формула 3), относительная частота.

Пример 1. В опытах на 33 крысах было показано, что окклюзия и последующая реперфузия коронарной артерии вызывают фибрилляции желудочков у 24 животных [5]. Необходимо рассчитать выборочные статистики, описывающие генеральную совокупность. В результате расчётов были получены следующие оценки:

$$\bar{p} = 24/33 \approx 0,73 \text{ (формула 1);}$$

$$s_m = \sqrt{\frac{24(33-24)}{33}} \approx 3 \text{ (формула 5);}$$

$$s_p = \sqrt{0,73 * 0,27} \approx 0,44 \text{ (формула 6);}$$

$$s_{\bar{p}} = \sqrt{\frac{0,73 * 0,27}{33}} \approx 0,08 \text{ (формула 8).}$$

В том же эксперименте было показано, что нарушения ритма сердца возникают у всех 33 крыс. В этом случае в расчёт относительной частоты вносят поправку, описанную выше, и он принимает следующий вид:

$$\bar{p} = 34 / 35 = 0,97 \text{ (формула 3);}$$

$$s_{\bar{p}} = \sqrt{\frac{0,97 * 0,03}{36}} \approx 0,03 \text{ (формула 9).}$$

При измерениях с помощью дихотомической шкалы, часто применяемых в фармакологических и токсикологических исследованиях, значительную информацию может дать расчёт доверительного интервала вероятности события. Если объём выборки мал ($np \leq 5$ и $nq \leq 5$), то для определения доверительного интервала используют свойства биномиального распределения. Интервальные оценки статистики p с доверительной вероятностью — являются решениями двух уравнений:

$$\sum_{x=m}^n C_n^x p_n^x (1-p_n)^{n-x} = \frac{1-P}{2};$$

$$\sum_{x=0}^m C_n^x p_n^x (1-p_n)^{n-x} = \frac{1+P}{2};$$

где n — объём выборки;

m — количество успехов;

P — доверительная вероятность.

Решение этих уравнений является достаточно нетривиальной задачей, в связи с этим для относительно небольших n пары решений p_n и p_a табулированы [6]. В таблицах [7, 8] указаны границы доверительных интервалов биномиального распределения для соответствующих n , m и p .

Пример 2. При введении 2 доз препарата 2 группам мышей по 6 штук в каждой в 1-й группе погибло 3 животных, во 2-й — 6. Каковы 95 % доверительные интервалы гибели мышей в обеих группах? По таблице [7] находим, что при $n = 6$ и $m = 3$ — 95 % доверительный интервал вероятности события составляет $0,12 \leq p \leq 0,88$, а при $m = 6$ — $0,54 \leq p \leq 1,00$.

Если объём выборки и статистика p достаточно велики, и биномиальное распределение можно аппроксимировать нормальным распределением, то p_n и p_a можно рассчитать, используя свойства этого распределения.

Действительно, если при больших значениях n статистика $\bar{p}$ имеет приближенно нормальное распределение, то её математическое ожидание p с доверительной вероятностью $1-\alpha$ находится в интервале:

$$\bar{p} - \frac{s_p}{\sqrt{n}} * z_{\alpha/2} \leq p \leq \bar{p} + \frac{s_p}{\sqrt{n}} * z_{\alpha/2},$$

где $Z_{\alpha/2}$ ($1-\alpha/2$) квантиль верхнего хвоста стандартного нормального распределения (при $\alpha = 0,05$, $Z_{\alpha/2} = 1,96$).

Квантили стандартного нормального распределения можно найти в математико-статистических таблицах [7, 8] или рассчитать, используя модуль «Вероятностный калькулятор» ППП «Statistica». То же относится к квантилям распределений Стьюдента и χ^2 . С помощью модуля «Вероятностный калькулятор» можно также рассчитать точные вероятности квантилей, полученных при проведении того или иного статистического теста.

Так как для биномиального распределения $\sigma = \sqrt{p(1-p)}$, то

$$\bar{p} - \frac{\sqrt{\bar{p}(1-\bar{p})}}{\sqrt{n}} * z_{\alpha/2} \leq p \leq \bar{p} + \frac{\sqrt{\bar{p}(1-\bar{p})}}{\sqrt{n}} * z_{\alpha/2},$$

от двойного неравенства переходим к неравенству с модулем $|p - \bar{p}| \leq \frac{\sqrt{\bar{p}(1-\bar{p})}}{\sqrt{n}} * z_{\alpha/2}$. Для того, чтобы

компенсировать ошибку, вносимую нормальной вероятностной кривой в точные значения с биномиальным распределением, в приведённое неравенство вводят поправку Йейтса на непрерывность, равную $1/(2n)$. В этом случае неравенство приобретает следующий вид: $|p - \bar{p}| - 1/(2n) \leq \frac{\sqrt{\bar{p}(1-\bar{p})}}{\sqrt{n}} * z_{\alpha/2}$. Возведя

обе части неравенства в квадрат, получаем квадратное неравенство относительно p . Решение этого неравенства $p_n \leq p \leq p_a$,

где

$$p_n = \frac{2n\bar{p} + z_{\alpha/2}^2 - 1 - z_{\alpha/2} \sqrt{z_{\alpha/2}^2 - (2 + 1/n) + 4\bar{p}(n\bar{q} + 1)}}{2(n + z_{\alpha/2}^2)}$$

$$p_a = \frac{2n\bar{p} + z_{\alpha/2}^2 + 1 + z_{\alpha/2} \sqrt{z_{\alpha/2}^2 - (2 - 1/n) + 4\bar{p}(n\bar{q} - 1)}}{2(n + z_{\alpha/2}^2)}, \quad (10)$$

где $\bar{q} = 1 - \bar{p}$. Описанные формулы дают хорошую аппроксимацию доверительных интервалов долей в том случае, если $np > 5$ и $nq > 5$.

Если $0,25 \leq \bar{p} \leq 0,75$, то формула расчёта доверительных границ несколько упрощается:

$$\bar{p} - z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\bar{p}\bar{q}}{n}} - \frac{1}{2n} \leq p \leq \bar{p} + z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\bar{p}\bar{q}}{n}} + \frac{1}{2n}, \quad (11)$$

Если $n \leq 30$, то вместо нормального распределения пользуются соответствующими квантилями распределения Стьюдента при числе степеней свободы $v = n - 1$ [6].

Пример 3. В опытах на 25 крысах было показано, что окклюзия и последующая реперфузия коронарной артерии вызывают фибрилляции желудочков у 17 животных. Необходимо вычислить, используя формулы 10 и 11, 95 % доверительный интервал вероятности возникновения этих нарушений ритма. $t_{0,024,24} = 2,06$; $\bar{p} = 0,68$; $\bar{q} = 0,32$. Так как $\bar{p}$ и $\bar{q}$ точечные оценки p и q , то можно полагать, что $\bar{p} \approx p$ и $\bar{q} \approx q$, тогда $np \approx n\bar{p} = 17 > 5$; $nq \approx n\bar{q} = 8 > 5$. При использовании полной формулы (10) получаем $0,455 \leq p \leq 0,848$, использование упрощённой формулы (11) даёт достаточно близкие доверительные границы $0,467 \leq p \leq 0,892$. Вычисленные доверительные интервалы близки к показателям, полученным с помощью таблицы доверительных интервалов биномиального распределения — $0,465 \leq p \leq 0,851$.

В тех случаях, когда условия применения аппроксимации нормальным распределением не соблюдаются, а таблицей доверительных интервалов биномиального распределения невозможно воспользоваться, можно использовать угловую трансформацию $P. Фишера$, который доказал, что величина $\phi = 2 \arcsin \sqrt{\bar{p}}$ (12) имеет приблизительно нормальное распределение (угол ϕ выражен в радианах). При расчёте с помощью этого метода сначала определяют величину ϕ , затем её доверительный интервал $\phi \pm z_{\alpha/2} / \sqrt{n}$ (13). Полученные значения границ ϕ пересчитывают в p по формуле $p = \sin^2 \phi / 2$ (14) [2]. Если $n \leq 30$ пользуются соответствующими квантилями распределения Стьюдента при числе степеней свободы $v = n - 1$.

Пример 4. Используем данные примера 3. В этом случае $\varphi = 2 \arcsin \sqrt{0,68} = 2 \times 0,97 = 1,94$ (формула 12), доверительный интервал φ , соответственно, равен $1,94 \pm 2,06/\sqrt{25}$ (формула 13), т. е. $1,528 \leq \varphi \leq 2,352$.

Тогда $\sin^2 \frac{\varphi_{\min}}{2} \leq p \leq \sin^2 \frac{\varphi_{\max}}{2}$ (формула 14), т. е.

$0,479 \leq p \leq 0,852$. Рассчитанный доверительный интервал мало отличается от показателей, полученных с помощью таблицы биномиального распределения в предыдущем примере.

Несколько по-иному рассчитывают доверительный интервал при p близком к 0 или 1 ($\bar{p} = 0$ или $\bar{p} = 1$), если невозможно воспользоваться таблицами доверительных интервалов биномиального распределения. В том случае, если $\bar{p} = 0$, нижней границей доверительного интервала является 0, верхнюю границу можно определить по следующим формулам:

$$p_6 = \frac{z_{\alpha/2}^2}{n + z_{\alpha/2}^2}, \quad (15)$$

$$p_8 = 1 - \sqrt[n]{\alpha}, \quad (16)$$

где $Z_{\alpha/2}$ ($1 - \alpha/2$) квантиль верхнего хвоста стандартного нормального распределения [9].

Если изучаемый эффект проявился у всех участвующих в эксперименте животных, верхняя граница доверительного интервала равна 1, а нижнюю границу можно определить по следующим формулам:

$$p_n = \frac{n}{n + z_{\alpha/2}^2}, \quad (17)$$

$$p_n = \sqrt[n]{\alpha}, \quad (18)$$

Пример 5. В опытах на 35 крысах изучали влияние вещества А на угнетение дыхания, вызываемое соединением М, соединение предотвратило гибель всех животных. Надо найти 95 % доверительный интервал вероятности отсутствия эффекта соединения М. По формуле 15 получаем доверительный интервал $0 \leq p \leq 0,099$; по формуле 16 $1 - p_8 = 1 - \sqrt[35]{0,05} = 0,082$, интервал равен $0 \leq p \leq 0,082$. По таблице доверительных интервалов биномиального распределения получаем $0 \leq p \leq 0,100$. Таким образом, с вероятностью более 95 % можно утверждать, что при продолжении экспериментов доля животных, которые погибнут, будет находиться в интервале от 0 до 0,100. Таким образом, использованные формулы дают вполне достаточное приближение.

Проверка гипотез об однородности двух выборок, измеренных в дихотомической (альтернативной) шкале

В фармакологических исследованиях очень часто возникает необходимость оценить различия между выборками, в которых оцениваемые показатели измерены в дихотомической шкале. Кроме того, часто

возникает необходимость перейти от количественной шкалы к альтернативной. Такие данные в статистике называют *независимыми испытаниями Бернулли*. Они обладают следующими свойствами:

1. Каждое отдельное испытание имеет ровно два возможных исхода, взаимно исключающих друг друга.
2. Вероятность данного исхода всегда одна и та же в любом испытании.
3. Все испытания независимы друг от друга.

Для совокупностей и выборок эти свойства формулируются следующим образом:

1. Каждый член совокупности принадлежит одному из двух классов.
2. Доля членов, принадлежащих к одному и тому же классу, неизменна; Каждый член выборки извлекается из совокупности независимо от других [6].
3. Данные, измеренные в шкале такого рода, представляют, как было указано выше, в виде абсолютных или относительных частот.

Блок-схема алгоритма выбора метода для сравнения выборок данных, описываемых в дихотомической шкале, приведена на рис. 1, объяснения к нему см. далее в тексте.

Сравнение двух независимых выборок

Предположим, существует две генеральные совокупности объектов неопределённой численности, в каждой из которых неизвестная относительная частота (доля) объектов, имеющих некоторое свойство, равна p_1 и p_2 . Разница этих генеральных долей равна $p_2 - p_1 = d$. Необходимо определить, существует ли эта разница. С этой целью необходимо из генеральных совокупностей извлечь выборки объёмом n_1 и n_2 , подсчитать в обеих выборках количество объектов m_1 и m_2 , обладающих вышеуказанным свойством, рассчитать выбороч-

ные доли $\bar{p}_1 = \frac{m_1}{n_1}$ и $\bar{p}_2 = \frac{m_2}{n_2}$ (доля объектов, у которых

отсутствует изучаемый признак, равна $1 - p = q$). Разница между выборочными долями $\bar{p}_2 - \bar{p}_1 = \bar{d}$ служит оценкой разницы между генеральными долями. Далее следует определить статистическую значимость этого различия.

С этой целью определяют нулевую гипотезу (H_0): $D = 0$. Альтернативная гипотеза (H_1) может быть двухсторонней ($D \neq 0$) или односторонней ($D > 0$ или $D < 0$).

К решению этой задачи существуют различные подходы. Если n_1 и n_2 достаточно велики, а именно $n_i \bar{p}_i \bar{q}_i > 9$ для $i = 1, 2$ и $0,25 \leq \bar{p}_i \leq 0,75$, можно воспользоваться тем, что биномиальное распределение при больших N и p , близком к 0,5, приближается к нормальному распределению [9]. Тогда отношение разности между долями к её стандартной ошибке даёт случайную величину $z = |\bar{d}| / s_{\bar{d}}$, которая следует распределению близкому к нормальному распределению. H_0 отвергают в пользу двухсторонней H_1 , если $z_{\text{факт}} \geq z_{\text{кр.}, \alpha/2}$ для принятого уровня значимости α , где $z_{\text{кр.}, \alpha/2}$ ($1 - \alpha/2$) — квантиль верхнего хвоста стандартного нормального

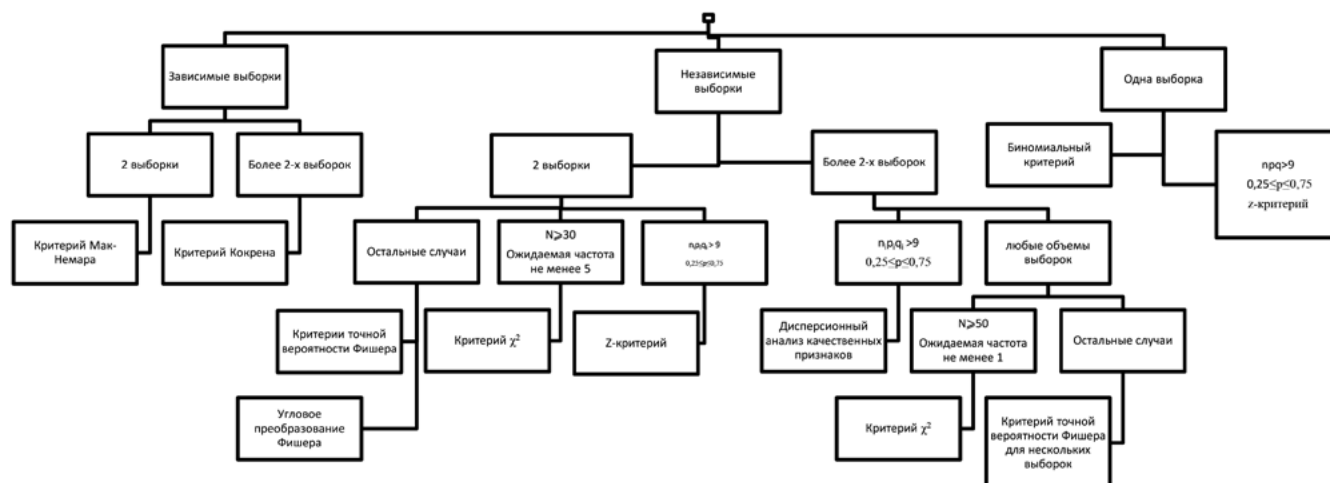


Рис. 1. Блок-схема алгоритма выбора метода для статистической обработки данных, измеренных в дихотомической шкале (объяснения см. в тексте)

распределения. В случае односторонней H_1 используют неравенство $z_{\text{факт}} \geq z_{\text{кр.}, \alpha}$.

Ошибка разности долей равна:

$$s_{\bar{d}_{\bar{p}}} = \sqrt{\frac{\bar{p}\bar{q}}{n_1 n_2} \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}, \quad (19)$$

где $\bar{p}$ и $\bar{q}$ средневзвешенные доли двух выборок.

$$\bar{p} = \frac{\bar{p}_1 n_1 + \bar{p}_2 n_2}{n_1 + n_2} = \frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2}; \quad \bar{q} = 1 - \bar{p}, \quad (20)$$

Таким образом, если доли выражены абсолютными частотами, то из формул 19 и 20 получаем:

$$s_{\bar{d}_{\bar{p}}} = \sqrt{\frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2} \left(1 - \frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2}\right) \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}, \quad (21)$$

Следовательно,

$$\begin{aligned} z &= \frac{|\bar{p}_2 - \bar{p}_1|}{\sqrt{\frac{\bar{p}(1 - \bar{p})}{n_1 n_2} \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}} = \\ &= \frac{|\bar{p}_2 - \bar{p}_1|}{\sqrt{\frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2} \left(1 - \frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2}\right) \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}} = \\ &= \frac{|m_2 / n_2 - m_1 / n_1|}{\sqrt{\frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2} \left(1 - \frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2}\right) \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}}, \end{aligned} \quad (22)$$

Однако формула 22 даёт несколько завышенные значения z , в результате вероятность ошибки I рода уменьшается. Этот факт связан с тем, что нормальное распределение, являющееся непрерывным, используется для аппроксимации дискретного распределения. Для того, чтобы нивелировать эту ошибку, Йейтс ввёл поправку на непрерывность, которая равна $-0,5(1/n_1 + 1/n_2)$. В окончательном виде формула вы-

глядит следующим образом [6, 9]:

$$\begin{aligned} z &= \frac{|\bar{p}_2 - \bar{p}_1| - 0,5(1/n_1 + 1/n_2)}{\sqrt{\frac{\bar{p}\bar{q}}{n_1 n_2} \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}} = \\ &= \frac{|m_2 / n_2 - m_1 / n_1| - 0,5(1/n_1 + 1/n_2)}{\sqrt{\frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2} \left(1 - \frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2}\right) \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}}, \end{aligned} \quad (23)$$

Описываемый критерий разработан в большинстве статистических пакетов программ.

Для разности долей генеральных совокупностей можно рассчитать $100(1 - \alpha)\%$ доверительный интервал. Пусть $z_{\alpha/2}$ обозначает величину, отсекающую долю вероятности $\alpha/2$ от верхнего хвоста стандартной нормальной кривой ($(1 - \alpha/2)$ -квантиль). Тогда интервал, включающий истинную разность пропорций, с вероятностью $1 - \alpha$ будет выглядеть следующим образом [6]:

$$\begin{aligned} (\bar{p}_2 - \bar{p}_1) - z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\bar{p}_1 \bar{q}_1}{n_1} + \frac{\bar{p}_2 \bar{q}_2}{n_2}} - 0,5 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right) \leq P_2 - P_1 \leq \\ \leq (\bar{p}_2 - \bar{p}_1) + z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\bar{p}_1 \bar{q}_1}{n_1} + \frac{\bar{p}_2 \bar{q}_2}{n_2}} + 0,5 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right). \end{aligned} \quad (24)$$

В том случае, если 0 в доверительный интервал разности не попадает, различия статистически значимы на уровне α .

Пример 6. На мухах дрозофилах дикого типа изучали антимутогенную активность нового соединения А. Результаты исследований показали, что в потомстве мух, обработанных препаратом Д, мутации наблюдались у 225 особей из 300 (75 %). При обработке родителей препаратом Д и изучаемым соединением мутации возникали у 130 мух из 270 (48 %). Необходимо определить статистическую значимость различий.

$H_0: D = 0$ (различия случайны).

$H_1: D < 0$ (изучаемое соединение уменьшает количество мутаций).

Уровень значимости: $\alpha = 0,005$, критерий одно-сторонний.

Используя формулу 23 получаем:

$$z = \frac{|m_2 / n_2 - m_1 / n_1| - 0,5(1/n_1 + 1/n_2)}{\sqrt{\frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2} \left(1 - \frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2}\right) \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}} =$$

$$= \frac{|130 / 270 - 225 / 300| - 0,5(1/300 + 1/270)}{\sqrt{\frac{225 + 130}{300 + 270} \left(1 - \frac{225 + 130}{300 + 270}\right) \frac{270 + 300}{270 * 300}}} =$$

$$= 6,52 > z_{0,005} = 2,58.$$

Таким образом, изучаемое вещество статистически значимо уменьшает количество мутаций, вызываемых препаратом Д. При этом 95 % доверительный интервал разности изучаемых генеральных совокупностей, рассчитанный по формуле 24, будет следующим:

$$(0,48 - 0,75) - 1,96 \sqrt{\frac{0,75 * 0,25}{300} + \frac{0,48 * 0,52}{270}} -$$

$$- 0,5 \left(\frac{1}{300} + \frac{1}{270} \right) \leq P_2 - P_1 \leq$$

$$\leq (0,48 - 0,75) + 1,96 \sqrt{\frac{0,75 * 0,25}{300} + \frac{0,48 * 0,52}{270}} +$$

$$+ 0,5 \left(\frac{1}{300} + \frac{1}{270} \right);$$

$$-0,351 \leq P_2 - P_1 \leq -0,189$$

В том случае, если условия применения вышеописанного критерия не соблюдаются, может быть использован метод проверки равенства долей, основанный на **угловой трансформации (φ-преобразовании Фишера)**. При анализе с помощью этого метода в доли вводят поправку Йейтса на непрерывность, равную $0,5/n$, которую вычитают из большей доли и прибавляют к меньшей доле. Затем находят $\varphi_i = 2 \arcsin \sqrt{p_i}$, где $i = 1, 2$. Рассчитывают отношение разности $\varphi_2 - \varphi_1$ к её ошибке, которую рассчитывают по формуле

$$s_{d\varphi} = \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}, \text{ т. е.}$$

$$z_{\text{рас.}} = \frac{\varphi_2 - \varphi_1}{\sqrt{1/n_1 + 1/n_2}} = (\varphi_2 - \varphi_1) \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}, \quad (25)$$

Нулевую гипотезу $D = 0$ отвергают на уровне значимости α в пользу двухсторонней $H_1: D \neq 0$ в том случае, если $|z_{\text{рас.}}| \geq z_{\text{кр.,}\alpha/2}$, где $z_{\text{кр.,}\alpha/2} = (1 - \alpha/2)$ квантиль верхнего хвоста стандартного нормального распределения. В случае односторонней гипотезы ($D > 0$ или $D < 0$) H_0 отвергают, если $|z_{\text{рас.}}| \geq z_{\text{кр.,}\alpha}$, где $z_{\text{кр.,}\alpha} = (1 - \alpha)$ квантиль верхнего хвоста стандартного нормального

распределения. В том случае, если количество степеней свободы $v = n_1 + n_2 - 2 \leq 30$, используют соответствующие квантили распределения Стьюдента [2, 3].

Для данного критерия действуют следующие ограничения:

1. Ни одна из долей не должна быть равна 0.

2. Если объём одной выборки равен 2, то во второй должно быть не менее 30 наблюдений: $n_1 = 2 \rightarrow n_2 \geq 30$. Если $n_1 = 3$, то $n_2 \geq 7$. Если $n_1 = 4$, то $n_2 \geq 5$. При $n_1, n_2 \geq 5$ возможны любые сопоставления [10]. При этом следует учитывать, что выражение результатов в виде относительных частот при $n \leq 20$ является не совсем адекватным [4].

Пример 7. На лабораторных крысах изучали тератогенное действие нового вещества. Оказалось, что в контрольной группе нарушения в формировании скелета возникали у 6 эмбрионов из 30 ($\bar{p}_1 = 0,2$), в опытной группе – у 21 из 35 ($\bar{p}_2 = 0,6$). Нужно определить, насколько значима разница.

$H_0: D = 0$ (различия между выборками не значимы).

$H_1: D \neq 0$ (различия между выборками статистически значимы).

Уровень значимости: $\alpha = 0,05$, критерий двух-сторонний.

Так как $p_1 < 0,3$, то следует применить угловую трансформацию Фишера.

$$\varphi_1 = 2 \arcsin \sqrt{0,2 + 1/60} \approx 0,9683;$$

$$\varphi_2 = 2 \arcsin \sqrt{0,6 - 1/70} \approx 1,7462,$$

где $1/60$ и $1/70$ поправки Йейтса на непрерывность равные $1/(2n)$. Тогда из формулы 25 получаем

$$z_{\text{рас.}} = (\varphi_2 - \varphi_1) \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \approx 4,421 > z_{0,005} = 2,58.$$

Следовательно, мы отвергаем H_0 на уровне значимости $\alpha = 0,01$ и полагаем, что препарат обладает тератогенным действием.

Во многих случаях при сравнении совокупностей, описываемых с помощью дихотомической шкалы, удобно пользоваться методами, основанными на анализе таблицы 2×2 (таблица два на два; табл. 1).

Таблица 1

Изучение тератогенного действия нового вещества

Выборка	Эффект присутствует	Эффект отсутствует	Всего
1	A	B	A + B
2	C	D	C + D
Всего	A + C	B + D	N = A + B + C + D

Примечание: A, B, C, D – абсолютные частоты изучаемого эффекта.

Одним из методов, используемых для анализа такой таблицы, является **критерий хи-квадрат (χ^2)**. Метод основан на предположении, что относительная частота $\bar{p}$ проявления эффекта в обеих выборках

одинакова, поэтому $p = (A + C) / N$. Тогда ожидаемые абсолютные частоты эффекта будут равны

$$f'_1 = (A + B)p = (A + B)(A + C) / N$$

и

$$f'_2 = (C + D)p = (C + D)(A + C) / N$$

в выборках 1 и 2, соответственно. Таким образом, ожидаемые частоты в каждой ячейке таблицы равны произведению сумм, пересекающихся строки и столбца деленному на общее количество объектов (N). Большое расхождение между фактическими частотами (f) и ожидаемыми частотами (f') — показатель того, что пропорции в этих двух выборках различаются (f' следует рассчитывать с точностью до 0,01). Статистика критерия χ^2 основывается именно на этом предположении. Формула для вычисления критерия χ^2 в случае, когда имеются две выборки, описываемые с помощью дихотомической шкалы, выглядит следующим образом:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{r=2} \sum_{j=1}^{c=2} \frac{(|f - f'| - 0,5)^2}{f'}, \quad (26)$$

где $\sum_{i=1}^{r=2} \sum_{j=1}^{c=2}$ указывает на необходимость просуммиро-

вать эти отношения по строкам и столбцам, 0,5 — поправка Йейтса на непрерывность. Полученную статистику сравнивают с критическим значением $\chi^2_{кр.,\alpha,v}$, где $v = (r - 1)(c - 1)$ — число степеней свободы, где r и c — количество строк и столбцов таблицы, соответственно (в разбираемом случае $v = 1$). Если рассчитанная $\chi^2 \geq \chi^2_{кр.,\alpha,v}$, то нулевая гипотеза о равенстве пропорций отвергается на уровне значимости α . Критические значения распределения χ^2 даны в соответствующих таблицах [7, 8]. Критические значения квантилей распределения χ^2 можно рассчитать, используя модуль «Вероятностный калькулятор» ППП «Statistica», в этом же модуле можно рассчитать точные вероятности квантилей, полученных при проведении статистических тестов.

Данный критерий разработан в практически во всех пакетах программ математической статистики [2, 6, 9, 11, 12].

Критерий χ^2 имеет следующие ограничения: 1. общее количество изучаемых объектов должно быть не менее 30 ($N \geq 30$); 2. ожидаемая частота в каждой ячейке таблицы 2×2 должна быть не менее 5 ($f' \geq 5$). Описываемый критерий является двухсторонним [6, 11, 12].

Пример 8. Используем данные примера 7.

H_0 : $D = 0$ (различия между выборками не значимы).

H_1 : $D \neq 0$ (различия между выборками статистически значимы).

Уровень значимости: $\alpha = 0,05$, критерий двухсторонний.

Построим таблицу 2×2 (табл. 2).

Таблица 2

Тератогенное действие нового вещества

Группы	Повреждения скелета есть	Повреждения скелета отсутствуют	Всего
Контроль	$A = 6$	$B = 24$	$A + B = 30$
Опыт	$C = 21$	$D = 14$	$C + D = 35$
Всего	$A + C = 27$	$B + D = 38$	$N = A + B + C + D = 65$

Рассчитываем ожидаемые частоты:

$$f'_A = 30 * 27 / 65 = 12,46;$$

$$f'_B = 30 * 38 / 65 = 17,54;$$

$$f'_C = 35 * 27 / 65 = 14,54;$$

$$f'_D = 35 * 38 / 65 = 20,46.$$

Тогда по формуле 26 получаем:

$$\begin{aligned} \chi^2 &= \frac{(|6 - 12,46| - 0,5)^2}{12,46} + \frac{(|24 - 17,54| - 0,5)^2}{17,54} + \\ &+ \frac{(|21 - 14,54| - 0,5)^2}{14,54} + \\ &+ \frac{(|14 - 20,46| - 0,5)^2}{20,46} \approx \\ &\approx 9,06 > \chi^2_{кр.,1;0,01} = 6,63. \end{aligned}$$

Таким образом, мы отвергаем H_0 на уровне значимости $p < 0,01$ и полагаем, что изучаемое вещество обладает тератогенным действием.

В некоторых случаях возникает необходимость обобщения нескольких таблиц сопряженности 2×2 , обрабатываемых с помощью критерия χ^2 . Например, такая необходимость возникает при анализе экспериментов, проведенных в различных лабораториях. В этих случаях используют тест Мантела—Ханзела. Представим, что мы имеем k таблиц 2×2 . Для каждой i -ой таблицы $(A_i + C_i) / N_i$ — доля изучаемых объектов, ответивших на воздействие положительной реакцией (см. табл. 1). Соответственно, $A_i / (A_i + B_i)$ и $C_i / (C_i + D_i)$ — доля положительных реакций в каждой из 2 выборок i -ой таблицы. Для того чтобы объединить результаты всех k анализируемых таблиц 2×2 и сравнить сразу эффекты у всех используемых в эксперименте объектов необходимо рассчитать объединенную статистику МН [2, 6]:

$$MH = \frac{\left\{ \sum_{i=1}^k [A_i - (A_i + C_i)(A_i + B_i) / N_i] \right\}^2}{\sum_{i=1}^k (A_i + C_i)(B_i + D_i)(A_i + B)(C_i + D_i) / [N_i^2 (N_i - 1)]}, \quad (27)$$

Указанная выше статистика учитывает различия между наблюдаемым и ожидаемым числом положительных реакций и имеет распределение χ^2 с 1 степенью свободы. Если рассчитанная статистика превышает табличное значение для критического уровня значимости, то нулевая гипотеза об отсутствии различий в эффекте отклоняется на указанном уровне значимости [2].

Пример 9. В 2 лабораториях проводили эксперименты по изучению противофибрилляторного действия нового вещества. В 1-й лаборатории в контрольной группе фибрилляции желудочков (ФЖ) возникали у 24 крыс из 33; в опытной группе — у 6 из 20 (табл. 3, а). Во 2-й лаборатории в контрольной группе ФЖ возникали у 15 животных из 20; в опытной группе у 4 из 19 (табл. 3, б). Имело смысл объединить результаты, полученные в обоих экспериментах.

Таблица 3

Изучение противофибрилляторного действия нового вещества

Группа	ФЖ возникают	ФЖ отсутствуют	Всего
Контрольная группа	$A_1 = 24$	$B_1 = 9$	33
Опытная группа	$C_1 = 6$	$D_1 = 14$	20
Всего	30	23	53

а

Группа	ФЖ возникают	ФЖ отсутствуют	Всего
Контрольная группа	$A_2 = 15$	$B_2 = 5$	20
Опытная группа	$C_2 = 4$	$D_2 = 16$	20
Всего	19	21	40

б

H_0 : $D = 0$ (различия между опытными и контрольными выборками не значимы).

H_1 : $D \neq 0$ (различия статистически значимы).

Уровень значимости: $\alpha = 0,05$, критерий двухсторонний.

По формуле 27 получаем:

$$MH = \frac{\{(24 - 30 * 33 / 53) + (15 - 19 * 20 / 40)\}^2}{30 * 23 * 33 * 20 / (53^2 * 52) + 19 * 21 * 20 * 20 / (40^2 * 39)} = 20,68 > \chi_{кр,0,001,1}^2 = 10,83.$$

Таким образом, H_0 об отсутствии статистически значимых различий между опытными и контрольными выборками должна быть отвергнута на уровне значимости $p < 0,001$.

Ограничений, свойственных критерию χ^2 , лишен **метод точной вероятности Фишера**. С помощью этого метода можно анализировать малые выборки ($n_i \geq 3$, где $i = 1, 2$) при любом распределении частот по ячейкам таблицы 2×2 . Вместе с тем, метод точной вероятности Фишера трудоёмок при исполнении в ручную, при этом трудоёмкость резко возрастает с увеличением

количества объектов в выборках. Однако современные статистические программы позволяют обрабатывать с помощью этого критерия достаточно большие выборки, так ППП «Statistica» поддерживает этот метод при $N \leq 500$. Процедура основана на переборе всех возможных вариантов заполнения таблицы 2×2 . Вначале по формуле гипергеометрического распределения вычисляют вероятность случайного получения фактически наблюдаемой таблицы 2×2 (см. табл. 1):

$$P_{набл.} = \frac{(A+B)!(C+D)!(A+C)!(B+D)!}{A!B!C!D!N!}, \quad (28)$$

($N! = 1*2*3*\dots*N$; $0! = 1$ — по определению).

Затем вычисляют вероятности всех других таблиц, имеющих такие же суммы по строкам и столбцам. При этом важны только те таблицы, вероятность получения которых не превышает таковой наблюдаемой таблицы ($P \leq P_{набл.}$). Полученные вероятности суммируют, если полученная сумма меньше или равна заданному уровню значимости, то нулевую гипотезу отвергают [2, 6, 11, 13].

Пример 10. На 2 группах мышей изучали частоту летального исхода, вызываемого двумя дозами одного и того же вещества. Меньшая доза вызвала смерть 1 мыши из 6, большая доза — 6 особей из 9. Необходимо выяснить, имеется ли в данном случае зависимость доза—эффект.

H_0 : $f_1 = f_2$ (мыши в обеих выборках гибнут с одинаковой частотой).

H_1 : $f_1 < f_2$ (во 2 выборке животные умирали чаще). Критерий односторонний, $\alpha = 0,05$.

Составим таблицу 2×2 (табл. 4).

По формуле 28 рассчитаем

Таблица 4

Частота летального исхода

Доза	Погибли	Выжили	Всего
Меньшая доза	$A = 1$	$B = 5$	$A + B = 6$
Большая доза	$C = 6$	$D = 3$	$C + D = 9$
Всего	$A + C = 7$	$B + D = 8$	$N = A + B + C + D = 15$

$$P_{набл.} = \frac{6!*9!*7!*8!}{1!*5!*6!*3!*15!} \approx 0,0783.$$

Будем уменьшать значения в ячейке А (наименьшее), не изменяя сумм по строкам и столбцам. Рассчитаем $P_1 = \frac{6!*9!*7!*8!}{0!*6!*7!*2!*15!} \approx 0,0056$. Таким образом, односторонняя $P_{1-стор.} = P_{набл.} + P_1 = 0,0783 + 0,0056 = 0,0839 > \alpha = 0,05$. Итак, мы принимаем нулевую гипотезу и полагаем, что увеличение дозы препарата не приводит к росту летальности.

Для того, чтобы рассчитать двухстороннюю вероятность, надо увеличивать значения в той же ячейке, не изменяя сумм по строкам и столбцам. Полученные

вероятности, не превышающие $P_{\text{набл.}}$, просуммировать с $P_{1\text{-сторон.}}$. Попробуем рассчитать вероятности:

$$P_2 = \frac{6! \cdot 9! \cdot 7! \cdot 8!}{2! \cdot 4! \cdot 5! \cdot 4! \cdot 15!} \approx 0,2937;$$

$$P_3 = \frac{6! \cdot 9! \cdot 7! \cdot 8!}{3! \cdot 3! \cdot 4! \cdot 5! \cdot 15!} \approx 0,33916;$$

$$P_4 = \frac{6! \cdot 9! \cdot 7! \cdot 8!}{4! \cdot 2! \cdot 3! \cdot 6! \cdot 15!} \approx 0,1958;$$

$$P_6 = \frac{6! \cdot 9! \cdot 7! \cdot 8!}{6! \cdot 0! \cdot 1! \cdot 8! \cdot 15!} \approx 0,0014.$$

Следовательно, $P_{2\text{-стор.}} = P_{1\text{-стор.}} + P_5 + P_6 = 0,0839 + 0,0336 + 0,0014 = 0,1189$.

Сравнение двух зависимых выборок

В практике работы исследователя фармаколога достаточно часто возникают ситуации, когда надо сравнивать у одних и тех же объектов реакции, оцениваемые с помощью альтернативной шкалы, до и после введения препарата. С этой целью используют **критерий МакНимара** (разработан в большинстве пакетов программ). При этом принято обозначать отсутствие реакции знаком минус, проявление изучаемой реакции знаком плюс. При регистрации результатов положительный ответ до и после введения обозначают знаком ++, отрицательный ответ до и после — —, смену отрицательного ответа на положительный — — +, смену положительного ответа на отрицательный — + —.

Для проведения статистической обработки необходимо построить таблицу 2×2 следующего вида (табл. 5):

Таблица 5

Регистрация результатов

Параметр		После		Сумма ответов «до»
		—	+	
ДО	+	A	B	A + B
	—	C	D	C + D
Сумма ответов «после»		A + C	B + D	

В ячейке A представляют количество изменений «до — после» от + к —, в ячейке D — от — к + (в ячейках B и C количество ответов, оставшихся без изменений). Именно основываясь на результатах, записанных в A и D, проводят статистический анализ при помощи критерия МакНимара. Если сумма частот в диагональных ячейках $A + D = N < 50$, то можно воспользоваться биномиальным распределением [2, 11, 14].

В этом случае $H_0: P = (1 - P) = 0,5$, т. е. количество смен плюс на минус равно количеству смен минус на плюс (P — вероятность смены положительного ответа на отрицательный).

Чтобы проверить гипотезу, необходимо подсчитать статистику B, которая равна количеству смен — на + (ячейка D).

H_0 против односторонней $H_1 P < (1 - P)$ на уровне значимости α отклоняют, если $B \geq b_{\alpha, N, 1/2}$, где константа $b_{\alpha, N, 1/2}$ — верхняя α -процентная точка биномиального распределения при объёме выборки N и $p = 0,5$, в противном случае нулевую гипотезу принимают.

H_0 против односторонней $H_1 P > (1 - P)$ на уровне значимости α отклоняют, если $B \leq (N - b_{\alpha, N, 1/2})$, в противном случае нулевую гипотезу принимают.

H_0 против двухсторонней $H_1 P \neq (1 - P)$ на уровне значимости α отклоняют, если $B \geq b_{\alpha, N, 1/2}$ или $B \leq N - b_{\alpha, N, 1/2}$, где $\alpha = \alpha_1 + \alpha_2$ ($b_{\alpha, N, 1/2}$ находят в таблицах) [11, 14]. Метод разработан в большинстве статистических программных пакетов.

Пример 11. В опытах на 20 спинальных (нарушение связи головного и спинного мозга) лягушках изучали местноанестезирующее действие нового вещества. О действии соединения судили по отдергиванию лапки в ответ на воздействие определённой концентрации кислоты до и после аппликации раствора вещества на нерв. Результаты опытов показали, что при первом испытании отдергивание лапки наблюдалось у 15 лягушек из 20. При испытании, проведённом после аппликации вещества, у 13 лягушек из 15, показавших в первом испытании положительную реакцию, отдергивание лапки отсутствовало. В то же время у 1 животного, у которого в предыдущем испытании реакция отсутствовала, после аппликации изучаемого соединения она появилась. Необходимо было выяснить, действительно ли вещество уменьшает частоту реакции в ответ на раздражение кожи кислотой.

$H_0: P = (1 - P) = 0,5$ — препарат не влияет на частоту реакции в ответ на раздражение кожи кислотой.

$H_1: P > (1 - P)$ — препарат уменьшает частоту изучаемой реакции.

Уровень значимости $\alpha = 0,05$, критерий односторонний.

Построим таблицу 2×2 (табл. 6).

Таблица 6

Изучение местноанестезирующего действия нового вещества

Параметр		После		Сумма ответов
		— Нет реакции	+ Есть реакция	
ДО	+ Есть реакция	A = 13	B = 2	A + B = 15
	— Нет реакции	C = 4	D = 1	C + D = 5
Сумма ответов «после»		A + C = 17	B + D = 3	

Из табл. 6 находим, что смена направленности реакции после введения препарата произошла у 14 лягушек ($N = 14$). В том числе отрицательная реакция сменилась на положительную у 1 животного (статистика $B = 1$). Находим, что $b_{0,0009;14,1/2} = 13$, тогда $B = 1 = N - b_{0,0009;14,1/2} = 1$. Следовательно, при $p = 0,0009$ мы можем отвергнуть нулевую гипотезу и предположить, что изучаемое вещество обладает местноанестезирующим действием.

В том случае, если $N = A + D \geq 50$, для анализа с помощью критерия МакНимара может быть использовано распределение χ^2 . При этом может быть применен упрощённый способ расчёта χ^2 :

$$\chi^2 = \frac{(|A - D| - 1)^2}{A + D}, \quad v = 1, \quad (29)$$

где $|A - D|$ — значение разности между частотами ячеек A и D по модулю, 1 в числителе — поправка на непрерывность. Если рассчитанное $\chi^2 \geq \chi_{кр.,\alpha,v}^2$, то нулевая гипотеза отвергается в пользу двухсторонней H_1 : $P \neq 1 - P$ или $A \neq D$ [2, 6, 11–13].

Пример 12. Возьмём данные предыдущего примера и увеличим все частоты в 4 раза. Тогда $A = 52$, $D = 4$.

H_0 : $P = 1 - P = 0,5$.

H_1 : $P \neq 1 - P$.

Уровень значимости $\alpha = 0,05$, критерий двухсторонний.

По формуле 29 рассчитаем

$$\begin{aligned} \chi^2 &= \frac{(|52 - 4| - 1)^2}{52 + 4} = \frac{47^2}{56} = \\ &= 39,45 >> \chi_{кр.;0,05,1}^2 = 3,84. \end{aligned}$$

Таким образом, на уровне значимости $p < 0,05$ мы можем отвергнуть нулевую гипотезу.

Сравнение выборочной и генеральной частот

Иногда исследователю приходится оценивать различия между известной генеральной долей p_0 и долей (относительной частотой) $\bar{p} = \frac{m}{n}$, полученной в экспериментальной выборке, где n — объём выборки, m — абсолютная частота изучаемого признака. В качестве нулевой гипотезы принимают предположение о том, что $\bar{p} = p_0$. Если экспериментальная выборка достаточно велика $n\bar{p}(1 - \bar{p}) > 9$ и $0,25 \leq \bar{p} \leq 0,75$, можно воспользоваться тем, что биномиальное распределение при большом объёме выборки и p близком к 0,5 приближается к нормальному распределению. Тогда отношение разности $d_p = \bar{p} - p_0$ к её ошибке даёт случайную величину $z = |d|/s_{d_p}$ (где $s_{d_p} = \sqrt{\frac{p_0(1 - p_0)}{n}}$), которая при числе степеней свободы $(n - 1)$ более 30 следует распределению близко к нормальному распределению. Так как мы ап-

роксимируем дискретное биномиальное распределение непрерывным нормальным распределением, то из $|d|$ следует вычесть поправку на непрерывность, которая равна $\frac{1}{2n}$. Поправка на непрерывность используется только в том случае, если $|d_p| > \frac{1}{2n}$. В результате получаем следующее выражение:

$$z_{\text{факт}} = \frac{|m/n - p_0| - 1/(2n)}{\sqrt{\frac{p_0(1 - p_0)}{n}}}. \quad (30)$$

H_0 отвергают в пользу двухсторонней H_1 , если $z_{\text{факт}} \geq z_{кр.,\alpha/2}$ для принятого уровня значимости α , где $z_{кр.,\alpha/2}$ — $(1 - \alpha/2)$ -квантиль верхнего хвоста стандартного нормального распределения. В случае односторонней H_1 используют неравенство $z_{\text{факт}} \geq z_{кр.,\alpha}$ [6, 9].

При $n < 50$ можно воспользоваться биномиальным критерием. Процедура анализа с помощью этого критерия выглядит следующим образом.

Необходимо проверить H_0 : $p = p_0$, где p_0 — ранее выявленная вероятность возникновения изучаемого события в генеральной совокупности.

Предположим, что M — число успехов в экспериментальной выборке объёма n .

Тогда, если $M \geq m_{\alpha,n,p_0}$ H_0 следует отвергнуть на уровне значимости α в пользу альтернативной односторонней H_1 : $p > p_0$, где m_{α,n,p_0} — верхняя α -процентная точка биномиального распределения при объёме выборки n и $p = p_0$. Значения m_{α,n,p_0} даны в таблицах [7, 8].

В случае альтернативной гипотезы $p < p_0$ H_0 следует отвергнуть на уровне значимости α , если $M \leq c_{\alpha,n,p_0}$, где c_{α,n,p_0} — нижняя α -процентная точка биномиального распределения при объёме выборки n и $p = p_0$.

В большинстве таблиц биномиального распределения представлены вероятности верхних хвостов, однако на основе этих таблиц можно рассчитать α -процентные точки нижних хвостов: $c_{\alpha,n,p_0} = m_{(1-\alpha),n,p_0} - 1$. Например, при $p_0 = 0,3$ и $n = 10$ необходимо найти такую нижнюю альфа процентную точку, чтобы уровень значимости α был не более 0,05. Тогда $1 - \alpha \geq 0,95$. По таблице находим, что $m_{0,9718,10,0,3} = 1$, следовательно, $c_{0,0282,10,0,3} = 0$. Следует учесть, что при маленьких объёмах выборок и низких p_0 нижние α -процентные точки, достаточные для того, чтобы отвергнуть H_0 на приемлемом уровне значимости, не могут быть найдены.

Если $p_0 = 0,5$, биномиальное распределение приобретает симметричный характер и в этом случае $c_{\alpha,n,p_0} = n - m_{\alpha,n,p_0}$.

Если $p_0 > 0,5$, то иногда удобнее перейти к оценке количества «неуспехов».

В случае H_1 : $p \neq p_0$, H_0 следует отвергнуть на уровне значимости α , если $M \geq m_{\alpha_1,n,p_0}$ или $M \leq c_{\alpha_2,n,p_0}$,

где m_{α_1, n, p_0} – верхняя α_1 -процентная точка; c_{α_2, n, p_0} – нижняя α_2 -процентная точка, $\alpha_1 + \alpha_2 = \alpha$.

При невыполнении условий, необходимых для того, чтобы отвергнуть нулевую гипотезу, H_0 следует принять [11, 14].

Пример 13. Из многочисленных статей известно, что двухсторонняя перевязка сонных артерий в течение 24 ч вызывает гибель 80 % крыс линии Wistar. В одном из экспериментов погибло 3 крысы из 10 [15]. Соответствуют ли эти данные результатам других исследователей?

Так как $p_0 = 0,8 > 0,5$, то следует подсчитывать количество «неуспехов», т. е. выживаемость. В этом случае $p_0 = 0,2$. Тогда полагаем:

$$H_0: p = p_0 = 0,2$$

$$H_1: p > p_0.$$

Уровень значимости $\alpha = 0,01$, критерий одно-сторонний.

Количество «неуспехов» $M = 7 = b_{0,0009,10,0,2} = 7$. Таким образом, на уровне значимости, равном 0,0009, H_0 следует отвергнуть и принять альтернативную гипотезу о том, что вероятность выживания животных в данном опыте была более 0,2. Итак, полученные результаты противоречат многочисленным данным литературы.

Если $n \geq 50$, то с помощью распределения χ^2 может быть получена достаточно точная аппроксимация биномиального критерия при любых p_0 . В случае дихотомической переменной тестовая статистика χ^2 рассчитывается по следующей формуле [11]:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^2 \frac{(|f_{\text{наб.}} - f_{\text{ож.}}| - 0,5)^2}{f_{\text{ож.}}}, \quad (31)$$

где: $f_{\text{наб.}}$ – наблюдаемая частота; $f_{\text{ож.}}$ – ожидаемая частота (в случае выполнения H_0); $|f_{\text{наб.}} - f_{\text{ож.}}|$ – абсолютная величина разности наблюдаемой и ожидаемой частот;

0,5 – поправка на непрерывность; $\sum_{i=1}^2$ – указывает на необходимость суммирования отношений по обоим значениям.

Ожидаемые частоты рассчитываются следующим образом: $f_{\text{ож.р}} = np_0$, $f_{\text{ож.г}} = n - np_0$.

H_0 следует отвергнуть на уровне значимости α в пользу двухсторонней $H_1: p \neq p_0$, если $\chi^2_{\text{расч.}} \geq \chi^2_{\text{кр.,}\alpha,v}$, где v – число степеней свободы; $v = k - 1$ (k – число градаций признака). Для дихотомической переменной $v = 1$. Критические значения распределения χ^2 даны в таблицах и могут быть рассчитаны с помощью пакетов программ.

Пример 14. Возьмём данные из примера 13 и увеличим выборку в 6 раз. В результате получим, что при ожидаемой смертности $p_0 = 0,8$ из 60 животных погибло 18. Отличается ли действительная вероятность гибели от ожидаемой?

$$H_0: p = p_0 = 0,8.$$

$$H_1: p \neq p_0.$$

Уровень значимости $\alpha = 0,01$, критерий двух-сторонний.

Составим следующую таблицу данных (табл. 7):

Таблица 7

Результаты исследования

Параметр	Погибли	Выжили
$f_{\text{наб}}$	18	42
$f_{\text{ож}}$	48	12
$ f_{\text{наб.}} - f_{\text{ож.}} - 0,5$	29,5	29,5

Из таблицы по формуле 31 получаем:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^2 \frac{(|f_{\text{наб.}} - f_{\text{ож.}}| - 0,5)^2}{f_{\text{ож.}}} =$$

$$= \frac{29,5^2}{48} + \frac{29,5^2}{12} \approx 90,65 \gg \chi^2_{\text{кр.,}0,01,1} = 6,635.$$

Таким образом, H_0 следует отвергнуть в пользу альтернативной гипотезы: $p \neq p_0 = 0,8$.

Методы сравнения нескольких выборок ($k > 2$) номинальных данных

Выше мы рассмотрели методы, позволяющие сравнить параметры двух статистических совокупностей. По своей сути в фармакологических исследованиях это выявление эффекта воздействия одного фактора, имеющего 2 уровня (градации). Однако в большинстве исследований действующих факторов и их градаций бывает, как правило, больше. Очень часто при такой ситуации исследователи проводят попарное сравнение большого количества групп с помощью методов, предназначенных для оценки различий 2 групп. Такой подход является грубой ошибкой, так как в этом случае вступает в силу эффект множественных сравнений.

Рассмотрим пример. Исследовали влияние соединений *A* и *B* на уровень артериального давления. Эксперимент проводили на 3 группах спонтанно гипертензивных крыс: I – в течение месяца получает вещество *A*; II – вещество *B*; III – эквивалентный объём растворителя. Статистическая обработка с помощью стандартного критерия показала, что в каждом из трёх сравнений $p < 0,05$, т. е. вероятность ошибки I рода менее 5 %. Однако это не совсем так. В действительности, так как мы допускаем 5 % процентную ошибку в каждом из сравнений, вероятность ошибки будет значительно больше. В общем случае эта вероятность равна: $P^* = 1 - (1 - p)k$, где k – количество сравнений, p – принятый нами критический уровень значимости. При небольшом количестве сравнений $P^* \approx pk$. Следовательно, в нашем случае вероятность ошибиться хотя бы в 1 из сравнений составляет не многим менее 15 % [13].

При проведении статистического анализа нескольких выборок, измеренных с помощью количественных шкал, используют дисперсионный анализ или его не-

параметрические аналоги с дальнейшей обработкой с помощью критериев множественных сравнений. Для анализа дихотомических данных была разработана модификация дисперсионного анализа, основанная на том, что при достаточно больших выборках биномиальное распределение хорошо аппроксимируется нормальным распределением. Однако этот анализ требует больших выборок, которые редко используются в экспериментальной фармакологии, программы для его проведения не разработаны, метод трудоёмок при выполнении вручную. В связи с этим дисперсионный анализ качественных признаков в настоящей статье разбирать не будет. Читатель может ознакомиться с ним в соответствующей литературе [16, 17].

Критерий χ^2

Для сравнения нескольких независимых выборок часто применяют **критерий χ^2** . Ранее мы рассмотрели критерий хи-квадрат для сравнения двух выборок (таблица 2 × 2). Однако этот метод может использоваться в более общих случаях (матрица $r \times c$, где $r, c \geq 2$). В общем случае число степеней свободы равно $(r - 1) \cdot (c - 1)$, тогда, если $v = (r - 1) \cdot (c - 1) > 1$, то поправка на непрерывность не нужна и формула вычисления хи-квадрат принимает следующий вид:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}, \quad (32)$$

где r — число строк матрицы;

c — число столбцов матрицы;

f_o — наблюдаемая частота признака (реакции);

f_e — ожидаемая частота признака в том случае, если справедлива H_0 о равенстве частот признака в изучаемых выборках. Ожидаемые частоты в каждой ячейке матрицы равны произведению сумм, пересекающихся строки и столбца, деленному на общее количество объектов (N). Большое расхождение между фактическими частотами (f_o) и ожидаемыми частотами (f_e) — показатель того, что пропорции в анализируемых выборках различаются (f_e следует рассчитывать с точностью до 0,01). Статистика критерия χ^2 основывается именно на этом предположении [2, 6, 11–13].

Полученную статистику сравнивают с критическим значением $\chi_{v,\alpha}^2$, где $v = (r - 1)(c - 1)$ — число степеней свободы. Если рассчитанная $\chi^2 \geq \chi_{v,\alpha}^2$, то нулевая гипотеза о равенстве пропорций отвергается на уровне значимости α . Критические значения распределения χ^2 даны в таблицах [7, 8] или можно рассчитать в модуле «Вероятностный калькулятор» ППП «Statistica». Метод разработан во всех пакетах статистических программ.

Критерий χ^2 для матрицы, большей, чем 2×2 , имеет следующие ограничения: 1. общее количество изучаемых объектов должно быть не менее 50 ($N \geq 50$); 2. ожидаемая частота в каждой ячейке матрицы должна быть не менее 1 ($f_e \geq 1$), а доля клеток с

ожидаемой частотой меньше 5 не должна превышать 20 %. Описываемый критерий является двухсторонним [6, 11–13].

Если нулевая гипотеза об отсутствии различий между выборками будет отвергнута, то следует выявить различия между отдельными выборками. С этой целью сравнивают наиболее близкие выборки, если статистически значимых различий нет, то их объединяют и сравнивают с другими выборками. При этом следует использовать поправку Бонферрони, т. е. α для $\chi_{кр.,\alpha,v}^2$ определяют следующим образом:

$$\alpha = \alpha_0/k,$$

где α_0 — критический уровень значимости;

k — количество сравнений [12, 13].

Пример 15. На трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии (АКМП) методом ДНК-комет изучали влияние препарата А на количество кардиомиоцитов, у которых повреждение ДНК составляло 75 % и более («ghost cells»). Результаты исследования представлены в табл. 8 [18].

Таблица 8

Влияние препарата на количество кардиомиоцитов с повреждением ДНК >75 %

Параметр	Интактные крысы	Крысы с АКМП	АКМП + А
Клетки с повреждением <75 %	А 593/601,35	В 543/522,67	С 521/532,98
«ghost cells»	Д 49/40,65	Е 15/35,33	Ф 48/36,02

H_0 : Различия между выборками отсутствуют.

H_1 : У контрольных крыс с АКМП «ghost cells» встречаются реже, чем у интактных животных и крыс с АКМП, получавших препарат А.

Критический уровень значимости $\alpha = 0,05$.

*В числителе наблюдаемая частота, в знаменателе — ожидаемая.

Рассчитаем ожидаемые частоты:

Ячейка А: $f_e = (A+D) \cdot (A+B+C)/N = 642 \cdot 1657/1769 = 601,35$;

Ячейка В: $f_e = (B+E) \cdot (A+B+C)/N = 558 \cdot 1657/1769 = 522,67$;

Ячейка С: $f_e = (C+F) \cdot (A+B+C)/N = 569 \cdot 1657/1769 = 532,98$;

Ячейка Д: $f_e = (A+D) \cdot (D+E+F)/N = 642 \cdot 112/1769 = 40,65$;

Ячейка Е: $f_e = (B+E) \cdot (D+E+F)/N = 558 \cdot 112/1769 = 35,33$;

Ячейка Ф: $f_e = (C+F) \cdot (D+E+F)/N = 569 \cdot 112/1769 = 36,02$.

Так как количество объектов превышает 50 и ожидаемая частота в ячейках более 5, можно применить критерий χ^2 . По формуле 32 рассчитаем наблюдаемую величину

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e} = \frac{(593 - 601,35)^2}{601,35} + \frac{(558 - 522,67)^2}{522,67} + \frac{(569 - 532,98)^2}{532,98} + \frac{(49 - 40,65)^2}{40,65} + \frac{(15 - 35,33)^2}{35,33} + \frac{(48 - 36,02)^2}{36,02} = 22,337.$$

Число степеней свободы данной матрицы равно 2. Рассчитанное $\chi^2 = 22,337 \gg 12,125 = \chi_{2;0,000014}^2$.

Таким образом, H_0 об отсутствии различий между выборками отвергается при $p < 0,000014$. Теперь необходимо выяснить, какие выборки различаются между собой. Начнём со сравнения 1 и 2 выборок. Составим таблицу 2×2 (табл. 9). Число степеней свободы в данном случае будет равно 1.

Таблица 9

Сравнение между выборками

Параметр	Интактные	АКМП+ А
Клетки с повреждением <75 %	A 593/590,58	B 521/523,42
“ghost cells”	C 49/51,42	D 48/45,58

Рассчитаем ожидаемые частоты:

Ячейка A: $f_e = (A+C)*(A+B)/N = 642*1114/1211 = 590,58$;

Ячейка B: $f_e = (B+D)*(A+B)/N = 569*1114/1211 = 523,42$;

Ячейка C: $f_e = (A+C)*(C+D)/N = 642*97/1211 = 51,42$;

Ячейка D: $f_e = (B+D)*(C+D)/N = 569*97/1211 = 45,58$.

Рассчитаем по формуле 26:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(|f_o - f_e| - 0,5)^2}{f_e} = \frac{(|593 - 590,58| - 0,5)^2}{590,58} + \frac{(|521 - 523,42| - 0,5)^2}{523,42} + \frac{(|49 - 51,42| - 0,5)^2}{51,42} + \frac{(|48 - 45,58| - 0,5)^2}{45,58} = 0,1659 = \chi_{1;0,6838}^2.$$

Таким образом, интактные животные и крысы с АКМП, получавшие препарат А, практически не различаются. В связи с этим их можно объединить и сравнить с контрольными крысами с АКМП (табл. 10).

Таблица 10

Сравнение с контрольной группой

	Объединённая выборка	Контроль с АКМП
Клетки с повреждением <75%	A 1114/1134,33	B 543/522,67
“ghost cells”	C 97/76,67	D 15/35,33

Рассчитаем ожидаемые частоты:

Ячейка A: $f_e = (A+C)*(A+B)/N = 1211*1657/1769 = 1134,33$;

Ячейка B: $f_e = (B+D)*(A+B)/N = 558*1657/1769 = 522,67$;

Ячейка C: $f_e = (A+C)*(C+D)/N = 1211*112/1769 = 76,67$;

Ячейка D: $f_e = (B+D)*(C+D)/N = 558*112/1769 = 35,33$.

Рассчитаем по формуле 26:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(|f_o - f_e| - 0,5)^2}{f_e} = \frac{(|1114 - 1134,33| - 0,5)^2}{1134,33} + \frac{(|543 - 522,67| - 0,5)^2}{522,67} + \frac{(|97 - 76,67| - 0,5)^2}{76,67} + \frac{(|15 - 35,33| - 0,5)^2}{35,33} = 17,358 = \chi_{1;0,000031}^2.$$

Таким образом, контроль с АКМП статистически значимо отличается от объединённой выборки (с учётом поправки Бонферрони $p = 0,000062$).

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что препарат А восстанавливает количество «ghost cells» в условиях АКМП до уровня, имеющегося у интактных животных.

В тех случаях, когда критерий χ^2 не может быть использован из-за имеющихся ограничений, обработку нескольких выборок биномиальных данных можно провести с помощью критерия точной вероятности Фишера. Первоначально этот критерий был разработан Рональдом Фишером для сравнения двух выборок (таблица 2×2) и основывался на гипергеометрическом распределении. В дальнейшем критерий точной вероятности Фишера был модифицирован для анализа таблиц $2 \times k$ [19–21]. Метод основан на многомерном гипергеометрическом распределении. Представим, что мы имеем таблицу из 2-х строк (R_1, R_2) и k столбцов. В каждом столбце находится $n_{1j} + n_{2j}$ объектов, характеризуемых каким-то бинарным признаком ($j = 1, \dots, k$). В строке R_1 находится $n_{11} + n_{12} + \dots + n_{1k}$ объектов, имеющих признак A^+ , в строке R_2 — $n_{21} + n_{22} + \dots + n_{2k}$, имеющих признак A^- . Сумма объектов в 1-й строке равна R_1 , во 2-й — R_2 . Общее количество объектов в таблице $N = \sum_{j=1}^k (n_{1j} + n_{2j}) = R_1 + R_2$. Тогда вероятность именно такого распределения объектов равна:

$$P(n_i) = \frac{1}{C_N^{R_1}} \prod_{j=1}^k C_{(n_{1j}+n_{2j})}^{n_{1j}},$$

где $C_n^m = \frac{n!}{m!(n-m)!}$ (число сочетаний из n по m),

Таблица 12

знак $\prod_{j=1}^k$ обозначает произведение. Путём перебора таких таблиц с неизменным количеством объектов по строкам и столбцам находят вероятности, меньшие или равные полученной в эксперименте, и суммируют их. Эта сумма и будет вероятностью ошибки I рода (вероятность отвергнуть верную нулевую гипотезу).

Различия между отдельными выборками находят, сравнивая их с помощью одномерного критерия точной вероятности Фишера и используя при этом поправку Бонферрони.

Так как перебор возможных таблиц очень трудоёмок, этот критерий сложно рассчитать вручную. Он реализован в программе doctorstat 2хс, которая свободно распространяется в интернете.

В предлагаемом ниже примере мы рассчитаем только конкретную вероятность полученной в эксперименте таблицы.

Пример 16. На трёх группах крыс по 6 животных в каждой изучали влияние 2 доз вещества А на частоту возникновения аритмий, вызываемых аконитином: 1 группа контроль – аконитин; аконитин + вещество в дозе 1; аконитин + вещество в дозе 2. Данные представлены в табл. 11.

$$P = \frac{C_6^1 C_6^4 C_6^6}{C_{18}^{11}} = \frac{6!6!11!7!}{5!1!4!2!6!0!18!} = 0,00283.$$

Таблица 11

Частота возникновения аритмий

Параметр	Группа 1	Группа 2	Группа 3
С аритмиями	5	2	0
Без аритмий	1	4	6

Однако вероятность ошибки первого рода несколько больше. Рассчитаем её с помощью программы: $p = 0,0181$. Таким образом, различия между выборками статистически значимы. Сравнивая 2-ю и 3-ю выборки с 1-й, получаем, что 1-я и 2-я группы практически не различаются (с учётом поправки Бонферрони $p = 0,48$), в то время как в 3-й – частота возникновения аритмий статистически значимо уменьшается (с учётом поправки Бонферрони $p = 0,03$).

В этом подразделе мы до сих пор рассматривали методы анализа нескольких независимых выборок номинальных данных. Однако иногда возникает необходимость сравнивать несколько зависимых выборок, когда оценка эффекта измеряется с помощью дихотомической шкалы. В этом случае может быть применён критерий Кокрена, который является расширением критерия Мак-Нимара [11–13].

Представим ситуацию, что проверяют реакцию n объектов на стимул в k ($k > 2$) различных условиях (табл. 12). Реакцию измеряют в дихотомической шкале (наличие реакции 1; отсутствие – 0).

Проверка реакции объектов

Объекты	Условия			
	1	2	...	k
1	X_{11}	X_{21}	...	X_{k1}
2	X_{12}	X_{22}	...	X_{k2}
...	...	...	...	...
n	X_{1n}	X_{2n}		X_{kn}

Нулевая гипотеза заключается в том, что в генеральной совокупности частота реакции на стимул при различных условиях (обработках) одинакова. Альтернативная гипотеза утверждает, что доля реакций при различных условиях не одинакова.

Для того, чтобы проверить H_0 , рассчитаем показатель Q :

$$Q = \frac{(k-1) \left[k \sum_{i=1}^k \left(\sum_{j=1}^n X_{ij} \right)^2 - \left(\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n X_{ij} \right)^2 \right]}{k \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^k X_{ij} - \sum_{j=1}^n \left(\sum_{i=1}^k X_{ij} \right)^2}, \quad (33)$$

где: $i = 1, \dots, k$ – номера условий (обработок, столбцов);
 $j = 1, \dots, n$ – номера объектов (строк). Показатель Q имеет распределение χ^2 при числе степеней свободы $v = k - 1$. Если $Q \geq \chi_{(k-1), \alpha}^2$, то H_0 отвергают при $p \leq \alpha$.

Для дальнейшего попарного сравнения обработок можно использовать критерий Мак-Нимара с поправкой Бонферрони.

Метод разработан в пакете программ “Statistika”.

Пример 17. На 15 мышах изучали влияние препарата А на появление реакции замиранья в ответ на резкий звук. Тестирования проводили до введения вещества, через 5, 15 и 30 минут после него (табл. 13).

H_0 : Препарат А не влияет появление реакции замиранья.

H_1 : Препарат А изменяет частоту появления реакции замиранья.

Критический уровень значимости $\alpha = 0,05$.

Число степеней свободы $v = 3$

Рассчитаем:

$$Q = \frac{(k-1) \left[k \sum_{i=1}^k \left(\sum_{j=1}^n X_{ij} \right)^2 - \left(\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n X_{ij} \right)^2 \right]}{k \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^k X_{ij} - \sum_{j=1}^n \left(\sum_{i=1}^k X_{ij} \right)^2} =$$

$$= \frac{3[4 * 350 - 1296]}{4 * 36 - 94} = 6,24 = \chi_{3;0,1005}^2$$

Таким образом, нулевая гипотеза должна быть принята при $p = 0,1005$. Проводить сравнение отдельных пар выборок нет необходимости.

Таблица 13

Изучение реакции животных на резкий звук

Номера животных	Условия				Σ
	Исходный уровень	5 минут после введения	15 минут после введения	30 минут после введения	
1	0	0	1	1	2
2	1	0	0	1	2
3	1	0	1	1	3
4	1	0	1	1	3
5	0	1	1	0	2
6	0	1	0	1	2
7	1	1	0	1	3
8	1	0	1	0	2
9	1	0	1	1	3
10	1	1	1	1	4
11	0	0	0	1	1
12	1	0	0	1	2
13	1	1	1	0	3
14	0	0	1	1	2
15	0	0	1	1	2
Σ	9	5	10	12	

И так, мы разобрали методы статистической обработки качественных (дихотомических) данных при различном дизайне постановки эксперимента.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Цорин Иосиф Борисович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: tsorinib@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN-код: 4015-3025

д. б. н., в. н. с. лаборатории

фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Tsorin Iosif

Corresponding author

e-mail: tsorinib@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN-code: 4015-3025

Doctor of biological sciences, leading researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

- Халафян А.А. STATISTICA 6. Математическая статистика с элементами теории вероятностей. — М.: Издательство Бином; 2010. [Halafian AA. STATISTICA 6. Matematicheskaya statistika s elementami teorii veroyatnostej. Moscow: Izdatel'stvo Binom; 2010. (In Russ).]
- Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. Издание 2-е. — М.: «ГЭОТАР-МЕДИА»; 2006. [Sergienko VI, Bondareva IB. Matematicheskaya statistika v klinicheskikh issledovaniyakh. Izdanie 2-e. Moscow: «GEOTAR-MEDIA»; 2006. (In Russ).]
- Лакин Г.В. Биометрия. — М.: «Высшая школа»; 1990. [Lakin GV. Biometriya. Moscow: «Vysshaya shkola»; 1990. (In Russ).]
- Ланг Т.А., Сесик М. Как описывать статистику в медицине. — М.: Практическая медицина; 2011. [Lang TA, Secic M. How to report statistics in medicine. Moscow: Prakticheskaya medicina; 2011. (In Russ).]
- Цорин И.Б. Фармакологическая защита ишемизированного миокарда: антагонисты кальция, специфические брадикардические средства, антигипоксанты. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. — М.: 1997. [Tsorin I.B. Farmakologicheskaya zashchita ishemizirovannogo miokarda: antagonisty kal'ciya, specificheskie bradikardicheskie sredstva, antigipoksanty. [dissertation] Moscow: 1997. (In Russ).] URL: <http://medical-diss.com/docreader/394996/a/#?page=1> (ссылка активна на 01.01.2019).

- Флейс Дж. Статистические методы для изучения таблиц долей и пропорций. — М.: «Финансы и статистика»; 1989. [Fleiss JL. Statistical Methods for Rates and Proportions. Moscow: «Finansy i statistika»; 1981. (In Russ).]
- Большев Л.Н. Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. Издание 3-е. — М.: «Наука»; 1983. [Bolshev LN, Smirnov NV. Tablicy matematicheskoy statistiki. Izdanie 3-e. Moscow: «Nauka»; 1983. (In Russ).]
- Ликеш И., Ляга И. Основные таблицы математической статистики. — М.: «Финансы и статистика»; 1985. [J. Likes, J. Laga. Zakladni Statice Tabulky. Praha: 1978. (In Russ).]
- Медик В.А., Токмачев М.С. Математическая статистика в медицине. — М.: «Финансы и статистика»; 2007. [Medic VA, Tokmachev MS. Matematicheskaya statistika v medicine. Moscow: «Finansy i statistika»; 2007. (In Russ).]
- Сидоренко Е.В. Методы математической обработки в психологии. — СПб.: Речь; 2001. [Sidorenko EV. Metody matematicheskoy obrabotki v psihologii. ST. PETERSBURG: Rech'; 2001. (In Russ).]
- Рунион Р. Справочник по непараметрической статистике. — М.: «Финансы и статистика»; 1982. [Runyon RP. Nonparametric statistics. Acontemporary approach. Addison-Wesley Publishing Company; 1977. (In Russ).]
- Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика. Издание 3-е. — М.: «ГЭОТАР-МЕДИА»; 2015. [Petrie A, Sabin C. Medical statistics at a glance. Third edition. Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication; 2009. (In Russ).]

13. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. — М.: Практика; 1998. [Glantz St.A. *Primer of biostatistics*. Fourth Edition. McGraw-Hill. Health Professions Division. New York; 1994. (In Russ).]
14. Холлендер М., Вулф Д.А. *Непараметрические методы статистики*. — М.: «Финансы и статистика»; 1983. [Hollander MH, Wolfe DA. *Nonparametric statistical methods*. John Wiley and Sons. New York, London, Sydney, Toronto; 1973. (In Russ).]
15. Силкина И.В. Анализ цереброваскулярных и нейропротекторных эффектов афобазола. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. — М.: 2005. [Silkina IV. Analiz crebrovaskulyarnyh i nejroprotektornyh effektov afobazola. [dissertation] Moscow; 2005. (In Russ).] URL: <http://medical-diss.com/docreader/175732/d#?page=1> Ссылка активна на 01.01.2019.
16. Плохинский Н.А. *Биометрия*. Издание 2-е. — М.: «Издательство Московского Университета»; 1979. [Plohinskij NA. *Biometriya*. Izdanie 2-e. Moscow: «Izdatel'stvo Moskovskogo Universiteta»; 1979. (In Russ).]
17. Крамаренко С.С. Дисперсионный анализ качественных признаков // *Крымский малакологический сайт*. 2006. [Kramarenko SS. Dispersionnyj analiz kachestvennyh priznakov. *Krymskij malakologicheskij sayt*. 2006. (In Russ).] URL: http://www.malacology.narod.ru/download/kramarenko_2006_disp.html.
18. Жанатаев А.К., Мирошкина И.А., Цорин И.Б., и др. Поврежденность ДНК в клетках миокарда крыс с экспериментальной алкогольной кардиомиопатией: модифицирующие эффекты фабомотизола и триметазида // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. — 2018. — № 2. — С. 28–31. [Zhanataev AK, Miroshkina IA, Tsorin IB, et al. DNA damage in myocardial cells of rats with experimental alcoholic cardiomyopathy: modifying effects of fabomotizole and trimetazidine. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;2:28–34. (In Russ).] DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10012.
19. Metha C.R., Patel N.R. A network algorithm for the exact treatment of the $2 \times k$ contingency table. *Communications in Statistics – Theory and Methods*. 1980;9(6):649–664.
20. Metha CR, Patel NR. A Network Algorithm for Performing Fisher's Exact Test in $r \times c$ Contingency Tables. *J. Amer. Statist. Assoc.* 1983;78(382):427–434. DOI: 10.1080/01621459.1983.10477989
21. Requena F, Ciudad NM. A major improvement to the network algorithm for Fisher's exact test in contingency tables. *Computational Statistics & Data Analysis*. 2006;51(2):490–498. DOI: 10.1016/j.csda.2005.09.004

Синтез цикло-L-пролилглицина и изучение его антипаркинсонической активности

Колясникова К. Н., Голубятникова А. К., Ребеко А. Г., Вуколова М. Н.,
Поварнина П. Ю., Кузнецова Е. А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. Цель работы состояла в разработке оптимальной схемы синтеза субстанции нейропептида цикло-L-пролилглицина (ЦПГ), потенциального препарата, полезного для комплексного лечения психиатрических патологий, включающих тревожные, депрессивные расстройства и нарушения когнитивных функций. Были рассмотрены две 4-стадийные схемы синтеза ЦПГ. Обе схемы привели к получению продукта с одинаковой оптической чистотой, сопоставимым общим выходом и временными затратами, однако первая схема в 2,5 раза выгоднее по стоимости основных реактивов на 100 г продукта. Первая схема нами отобрана в качестве основы для разработки лабораторного регламента. Также выявлена впервые антипаркинсоническая активность ЦПГ (0,05 и 0,5 мг/кг внутрибрюшинно) на модели галоперидоловой катаlepsии.

Ключевые слова: цикло-L-пролилглицин; нейропептид; пептидный синтез; антипаркинсоническая активность; галоперидоловая катаlepsия

Для цитирования:

Колясникова К.Н., Голубятникова А.К., Ребеко А.Г., Вуколова М.Н., Поварнина П.Ю., Кузнецова Е.А. Синтез цикло-L-пролилглицина и изучение его антипаркинсонической активности // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 3. – С. 19–26. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10051

Synthesis of cyclo-L-prolylglycine and study of its anti-parkinsonian activity

Koliasnikova KN, Golubyatnikova AK, Rebeko AG, Vukolova MN, Povarnina PYu, Kuznetsova EA

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. The aim of the work was to develop an optimal scheme for the synthesis of substance of cyclo-L-prolylglycine neuropeptide (CPG), a potential drug useful for the integrated treatment of psychiatric pathologies, including anxiety, depressive disorders and cognitive impairment. Two 4-stage CPG synthesis schemes were considered. Both schemes led to a product with the same optical purity, comparable to the overall yield and time-consuming, however, the first scheme is 2.5 times more profitable in terms of the cost of basic reagents per 100 g of product. The first scheme was selected as the basis for the development of laboratory regulations. Also for the first time the anti-parkinsonian activity of CPG (0.05 and 0.5 mg/kg intraperitoneally) on a model of haloperidol catalepsia was detected.

Keywords: cyclo-L-prolylglycine; neuropeptide; peptide synthesis; antiparkinsonian activity; haloperidol catalepsia

For citations:

Koliasnikova KN, Golubyatnikova AK, Rebeko AG, Vukolova MN, Povarnina PYu, Kuznetsova EA. Synthesis of cyclo-L-prolylglycine and study of its anti-parkinsonian activity. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;3:19–26. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10051

Введение

В 1996 г. в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова был открыт новый нейропептид цикло-L-пролилглицин (ЦПГ) [1], структура которого ранее была предложена в качестве дипептидного топологического аналога классического ноотропа пирacetama [2]. Позже зарубежными исследователями было показано, что предшественником ЦПГ является инсулиноподобный фактор роста [3]. Изучение спектра фармакологической активности выявило наличие у ЦПГ ноотропных, анксиолитических, антигипоксических и нейропротекторных свойств [4–7]. Недавно были выявлены антидепрессивная [8] и анальгетическая [9] активности этого нейропептида. ЦПГ способен оказывать положительное модулирующее действие на глутаматные AMPA-рецепторы [10] и, как и другие положительные модуляторы AMPA-рецепторов, приводить к усилению синтеза мозгового нейротрофического фактора (BDNF) [11].

Таким образом, ЦПГ можно рассматривать как потенциальный препарат, полезный для комплексного

лечения психиатрических патологий, включающих тревожные, депрессивные расстройства и нарушения когнитивных функций. Необходимым этапом создания любого лекарственного препарата является разработка оптимального метода синтеза субстанции, что явилось целью настоящей работы. Кроме того, нами была изучена антипаркинсоническая активность ЦПГ на модели галоперидоловой катаlepsии на мышах.

Материалы и методы

Экспериментальная химическая часть

Температуру плавления определяли в открытых капиллярах с использованием прибора OptiMelt MPA 100 (США) и не корректировали. ¹H-ЯМР спектры регистрировали на спектрометре Bruker AC-250 (Германия) в растворах CDCl₃ и DMSO-d₆, используя в качестве внутреннего стандарта ТМС. Удельное оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin-Elmer-241. ТСХ проводили на пластинах Kieselgel 60 F 254 (Merck). Соединения с амидными группами

обнаруживали в парах йода, соединения с открытой карбоксильной группой — бромкрезоловым зелёным, содержащие ароматические группы — в УФ-лучах. Используемые растворители очищали и сушили стандартными методами. Элементный анализ проводили на приборе для определения углерода и водорода с четырьмя электрическими печами (600–900 °С, тип МА-Г/6Р, завод ЛЭТО, Россия) в токе кислорода и на аппарате для определения азота с тремя такими же электрическими печами в токе углекислого газа. Данные элементного анализа соединений относительно процентного содержания С, Н и N отклоняются от теоретических не более чем на 0,4 %.

Схема 1

а) *N*-(Трет-бутилоксикарбонил)-глицин (Вос-Gly-ОН). К раствору 7,5 г (0,1 моль) глицина в 100 мл 1 н раствора NaOH прибавляли раствор 5 г NaHCO₃ в 50 мл воды, 100 мл диоксана и 26,6 г (0,11 моль) ди-трет-бутилпиروкарбоната. Смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре, затем добавляли 200 мл воды. Избыток ди-трет-бутилпирокарбоната экстрагировали петролевым эфиром (2 × 150 мл). К водному раствору добавляли 150 мл этилацетата, подкисляли лимонной кислотой до pH 4–5 (по универсальному индикатору), экстрагировали этилацетатом (2 × 150 мл). Экстракт промывали насыщенным раствором NaCl (2 × 150 мл) и высушивали над Na₂SO₄. Растворитель удаляли в вакууме. Остаток в виде жёлтого масляобразного вещества кристаллизовали под смесью диэтилового эфира и гексана, кристаллы отфильтровывали, сушили в вакууме. Выход 15,3 г (89 %); *R_f* 0,4 (хлороформ — метанол 10:1). Т.пл. — 96–98 °С. Лит. [12] — Т.пл. 94–95 °С.

б) Хлоргидрат метилового эфира *L*-пролина (H-*L*-Pro-OMe·HCl). К 60 мл метилового спирта, охлаждённого до –20 °С, прибавляли по каплям 2,54 мл (34,64 ммоль) тионилхлорида и порциями вносили 2 г (17,32 ммоль) *L*-Pro-ОН. Суспензию перемешивали 2 ч при –5 °С, и 2 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме; эту операцию повторяли дважды, каждый раз добавляя 30 мл метанола. Остаток в виде жёлтого масла кристаллизовали под диэтиловым эфиром, отфильтровывали, высушивали в вакууме. Выход — 2,7 г (94 %); Т.пл. — 68–70 °С; *R_f* 0,75 (изопропиловый спирт — водный аммиак 7:3). [α]_D²⁰ — 33° (с 1, метанол). Лит. [13] — Т.пл. 71 °С. [α]_D²⁰ — 32,6° (с 2, метанол).

в) Метилловый эфир *N*-трет-бутилоксикарбонил-глицил-*L*-пролина (Вос-Gly-*L*-Pro-OMe). К раствору 1,06 г (6,04 ммоль) *N*-трет-бутилоксикарбонил-глицина и 0,68 мл (6,04 ммоль) *N*-этилморфолина в 12 мл этилацетата, охлаждённого до –12 °С, прибавляли 0,79 мл (6,04 ммоль) изобутилхлорформиата (ИБХФ) при интенсивном перемешивании. Через 2–3 мин в реакционную смесь прибавляли по каплям раствор 1,00 г (6,04 моль) хлоргидрата метилового эфира *L*-пролина

и 0,68 мл (6,04 ммоль) *N*-этилморфолина в смеси 4 мл ДМФА и 4 мл этилацетата. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при –12 °С и 1 ч при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали. Растворители удаляли в вакууме. Остаток растворяли в хлороформе. Промывали 5 % водным раствором NaHCO₃ (2 × 40 мл), водой (2 × 40 мл), 1 н лимонной кислотой (2 × 40 мл), водой до pH 5÷6 по универсальному индикатору, высушивали над MgSO₄. Осушитель отфильтровывали, растворитель удаляли в вакууме. Вещество получено в виде масла. Выход 1,52 г (88 %). [α]_D²⁰ –25° (с 1, метанол); *R_f* 0,85 (хлороформ — этанол, 9:1) (Лит [13] *R_f* 0,85 (хлороформ — этанол, 9:1); [α]_D²² –27° (с 1, метанол)). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃), δ, м.д.: 1,19 (с, 9H, (CH₃)₃), 1,64–1,98 (м, 4H, C^γH₂ Pro, C^βH₂ Pro), 3,17–3,42 (м, 2H, C^δH₂ Pro), 3,48 (с, 3H, O-CH₃), 3,70 (м, 2H, C^αH₂ Gly), 4,25 (д, 2H, C^αH₂ Pro), 5,17 (уш. с, 1H, NH).

г) Цикло-*L*-пролилглицин (cyclo-*L*-Pro-Gly). Раствор 2,30 г (8,00 ммоль) Вос-Gly-*L*-Pro-OMe в 50 мл муравьиной кислоты (96 %) выдерживали 2 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме (при 40 °С). К остатку прибавляли 60 мл толуола и 120 мл изобутанола и кипятили 2,5 ч с насадкой Дина—Старка. Растворители удаляли в вакууме. Остаток кристаллизовали из этанола. Полученные кристаллы отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром, высушивали на воздухе. Выход — 1,54 г (83 %). Т.пл. — 207–209 °С (с разложением); [α]_D²⁰ –206° (с 1, вода) (Лит [14] Т.пл. — 213–214 °С; [α]_D²⁰ –214° (с 4, вода)); *R_f* 0,45 (бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1), *R_f* 0,27 (хлороформ — этанол, 12:1). ¹H-ЯМР-спектр (DMCO-*d*₆ + CF₃COOD), δ, м.д.: 1,7–2,2 (м, 4H, C^γH₂ Pro, C^βH₂ Pro), 3,39 (м, 2H, C^δH₂ Pro), 3,53 и 4,0 (2 д, 2H, J 16,65 Hz, C^αH₂ Gly), 4,13 (д.д., 1H, C^αH Pro), 8,11 (уш. с, 1H, NH). Элементный анализ: вычислено, %: С 54,54; Н 6,54; N 18,17; найдено, %: С 54,61; Н 6,51; N 18,22; C₇H₁₀N₂O₂.

Схема 2

а) *N*-Карбобензоксиглицин (Z-Gly-ОН). К раствору 7,5 г (0,1 моль) глицина в 25 мл 4 н раствора NaOH (0,1 моль), охлажденному до –5 °С, при перемешивании и охлаждении прибавляли порциями в течение 20–30 мин 30 мл 4 н NaOH (0,12 моль) и 13,8 мл (0,11 моль) карбобензоксихлорда. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, избыток карбобензоксихлорда экстрагировали 20 мл диэтилового эфира. Водную фазу при охлаждении льдом подкисляли 5 н HCl до слабощелочной реакции, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали на воздухе. Перекристаллизовывали из хлороформа. Выход — 15,3 г (76 %); Т.пл. — 117–118 °С. Лит. [15] Т.пл. — 120 оС.

б) Хлоргидрат этилового эфира *L*-пролина (H-*L*-Pro-OC₂H₅·HCl). К 100 мл абсолютного этанола, охлаждённого до –20 °С, прибавляли по каплям 14,6 мл (0,2 моль) тионилхлорида и порциями вносили 11,5 г

(0,1 моль) *L*-пролина. Далее реакционную смесь перемешивали 2 ч при -5°C и 2 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме; эту операцию повторяли дважды, каждый раз добавляя 50 мл абсолютного этанола. Получали 16,9 г (95 % хлоргидрата этилового эфира *L*-пролина в виде желтого масла. $[\alpha]^{23}_D -43^{\circ}$ (с 3, этанол); R_f 0,75 (изопропиловый спирт – водный аммиак 7:3). ^1H -ЯМР-спектр ($\text{DMCO}-d_6$) δ , м.д.: 1,19 (м, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1,8–2,1 (м, 4H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$ Pro, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Pro), 3,2 (м, 2H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Pro), 4,2 (м, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4,5 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Pro), 9,9 (уш.с., 1H, NH). Лит. данные [16]: масло; $[\alpha]^{23}_D -44,8^{\circ}$ (с 3,03, этанол).

в) **Этиловый эфир *N*-карбобензоксиглицил-*L*-пролина (*Z*-Gly-*L*-Pro-OEt).** К раствору 4,17 г (20 ммоль) карбобензоксиглицина в 100 мл этилацетата, охлажденному до -15°C , при интенсивном перемешивании прибавляли 2,25 мл (20 ммоль) *N*-метилморфолина и 2,68 мл (20 ммоль) ИБХФ. Через 2–3 мин в реакционную смесь прибавляли по каплям раствор 3,30 г (20 ммоль) хлоргидрата этилового эфира *L*-пролина и 2,25 мл (20 ммоль) *N*-метилморфолина в 35 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при -12°C и 1 ч при комнатной температуре. Растворители удаляли в вакууме. Остаток растворяли в хлороформе. Промывали 5 % водным раствором NaHCO_3 (2×40 мл), водой (2×40 мл), 1 н соляной кислотой (2×40 мл), водой, высушивали над Na_2SO_4 . Осушитель отфильтровывали, растворитель удаляли в вакууме. Вещество получено в виде масла. Выход – 5,35 г (80 %). R_f 0,83 (хлороформ – метанол, 9:1) (Лит [14] R_f 0,83 (хлороформ – метанол, 9:1)).

г) **Цикло-*L*-пролилглицин (*cyclo-L*-Pro-Gly).** К раствору 0,57 г (1,7 ммоль) *Z*-Gly-Pro-OEt в 100 мл ДМФА прибавляли 0,45 г 10 % Pd/C и через раствор при перемешивании пропускали водород в течение 2 ч. Раствор упаривали, остаток растворяли в спирте, катализатор отфильтровывали, растворитель удаляли в вакууме. Остаток кристаллизовали из этанола. Выход – 0,239 г (92 %). Т.пл. – $205\text{--}207^{\circ}\text{C}$ (с разложением); $[\alpha]^{20}_D -202^{\circ}$ (с 1, вода). R_f 0,45 (бутанол – уксусная кислота – вода, 4:1:1), R_f 0,27 (хлороформ – этанол, 12:1). ^1H -ЯМР-спектр ($\text{DMCO}-d_6 + \text{CF}_3\text{COOD}$), δ , м.д.: 1,7–2,2 (м, 4H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$ Pro, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Pro), 3,40 (м, 2H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Pro), 3,54 и 4,0 (2 д, 2H, J 16,6 Hz, $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$ Gly), 4,12 (д.д., 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Pro), 8,10 (уш.с., 1H, NH). Элементный анализ: вычислено, %: C 54,54; H 6,54; N 18,17; найдено, %: C 54,41; H 6,54; N 18,20; $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$.

Экспериментальная фармакологическая часть

Животные. В экспериментах были использованы мыши-самцы линии BALB/C весом 21–24 г, полученные из Центрального питомника лабораторных животных Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Московская область. Содержание животных соответствовало прави-

лам лабораторной практики (GLP) и нормативным документам «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев», утвержденным Главным Государственным санитарным врачом 06.04.1973 г. №1045-73 и Приказом МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Эксперименты проводили с 10 до 16 ч. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Галоперидоловую катаlepsию вызывали внутрибрюшинным введением галоперидола в дозе 1 мг/кг. Пирацетам, ЦПГ или физиологический раствор вводили внутрибрюшинно (в/б) в день эксперимента за 15 мин до введения галоперидола (1 мг/кг, в/б). Первой группе ($n = 7\text{--}10$ для каждой группы) вводили физраствор, второй группе – пирацетам или ЦПГ в разных дозах. Через 60 мин после введения галоперидола регистрировалась катаlepsия: животное помещалось на параллельные перекладки на высоте 4 см таким образом, чтобы спина животного была прямой. Фиксировалось время пребывания мышей в неподвижном состоянии в течение 2 мин [17].

Статистические методы. Для выявления различий между экспериментальными группами были применены статические методы: One-Way-ANOVA и *t*-Test.

Результаты и обсуждение

Для циклического дипептида не имеет значения, в каком порядке аминокислоты шли в исходном линейном пептиде, однако от этого зависят выход и оптическая чистота продукта. Например, выбор глицина в нашем случае в качестве карбоксильной компоненты при получении защищенного Gly-Pro снижает риск рацемизации из-за отсутствия в молекуле этой аминокислоты хирального центра. Известно [18, 19], что наличие имидной связи при пролине в дипептидной последовательности Gly-Pro, отсутствующей в Pro-Gly, увеличивает долю цисоидной конформации пептидной связи, что, в свою очередь, способствует внутримолекулярной циклизации [20, 21]. Таким образом, для получения ЦПГ рационально использовать дипептиды с последовательностью Gly-Pro.

Известно, что использование трет-бутилокси-карбонильной (Boc) защитной группы для аминогруппы и сложноэфирной для карбоксильной позволяет в мягких условиях (кислотный катализ) удалять защиту с аминогруппы и получать требуемый эфир в виде соответствующей соли. Удаление бензилоксикарбонильной (Z) защитной группы также проводится в мягких условиях каталитического гидрогенолиза. Метилловые эфиры аминокислот обычно легче подвергаются циклизации, чем этиловые за счёт меньших пространственных затруднений, поэтому в качестве защиты для карбоксильной группы целесообразно выбрать метилловые эфиры.

Среди методов образования пептидной связи наиболее широко используются методы смешанных ангидридов и активированных эфиров. Для получения защищённого Gly-Pro нами был выбран первый метод. К преимуществам данного метода можно отнести низкую стоимость реагентов, высокую скорость конденсации при низкой температуре, достаточно высокий выход продукта. Проведение реакции в условиях Андерсона [22] позволяет избежать рацемизации.

Важным является выбор условий циклизации. Циклизацию можно проводить путём кипячения водного раствора метилового эфира Вос-защищённого дипептида в автоклаве согласно [23], однако в этом случае существует риск рацемизации. Менее склонный к потере оптической чистоты метод состоит в снятии Вос-защиты муравьиной кислотой и последующей циклизацией в смеси 2-бутанол–толуол с азеотропной отгонкой [24]. Мы провели сравнение схемы синтеза ЦПГ на основе последнего метода циклизации (схема 1, рис. 1) с синтезом ЦПГ с использованием Z-защищённого дипептида и реакции каталитического гидрогенолиза по схеме 2 (рис. 2) [14].

По схеме 1 ЦПГ был получен циклизацией при нагревании в смеси 2-бутанол–толуол (2:1) метилового эфира глицил-L-пролина, который, в свою очередь, получали без выделения из Вос-Gly-L-Pro-OMe деблокированием муравьиной кислотой. Защищённый дипептид получали методом смешанных ангидридов с использованием изобутилхлорформиата в условиях Андерсона [22]. В качестве карбоксильной компоненты использовали Вос-Gly-OH, а в качестве аминокомпоненты — метиловый эфир пролина, который получали в метаноле в присутствии хлористого тионила по методу Бреннера [25]. Общий выход составил 60 % в расчёте на исходный пролин.

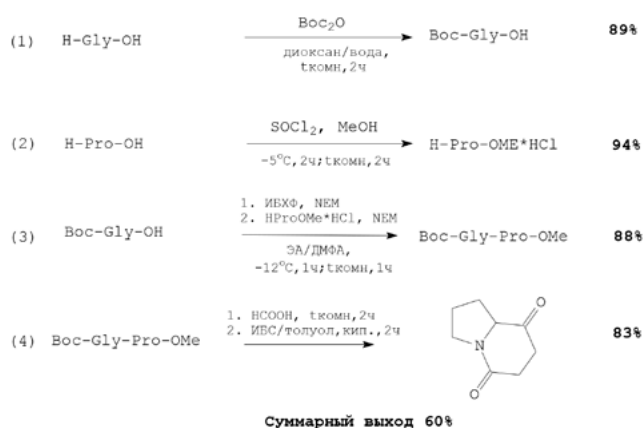


Рис. 1. Схема 1 получения ЦПГ

Второй способ получения ЦПГ основан на защищённом дипептиде Z-Gly-L-Pro-OEt [14] (схема 2, рис. 2), который получали методом смешанных ангидридов в условиях Андерсона [22]. В качестве карбоксильной компоненты использовали Z-Gly-OH, а в качестве

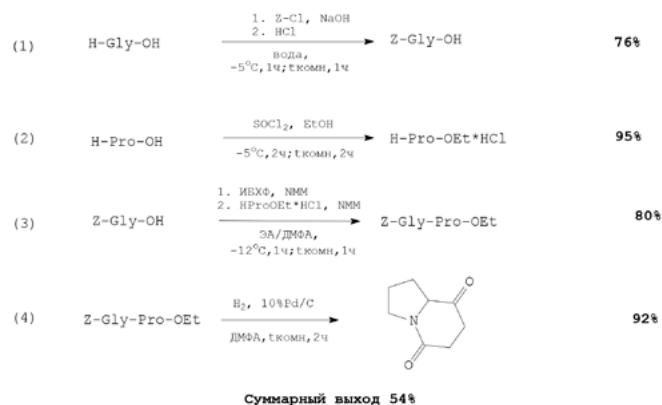


Рис. 2. Схема 2 получения ЦПГ

аминокомпоненты — этиловый эфир пролина, который получали этерификацией абсолютным этанолом в присутствии хлористого тионила по методу Бреннера [25]. Каталитический гидрогенолиз Z-Gly-L-Pro-OEt в ДМФА над 10 % Pd/C сопровождался самопроизвольной циклизацией в дикетопиперазин, при этом циклизация проходила с высоким выходом (92 %) и без рацемизации. Суммарный выход составил 54 % в расчёте на исходный пролин.

Для перекристаллизации ЦПГ в обоих случаях использовали этиловый спирт-ректификат, поскольку он менее токсичен, чем предлагаемый в литературе для этой цели ацетон [26]. Структура ЦПГ была подтверждена ¹H ЯМР, химическая чистота — данными элементного анализа.

При сравнении способов получения ЦПГ в качестве критерия оптимальности принималась оптическая чистота конечного продукта, а при равной оптической чистоте — экономические показатели синтеза. По количеству стадий синтеза по схемам 1 и 2 не различаются и оба состоят из 4 стадий.

В таблице 1 представлено сравнение двух способов синтеза ЦПГ. Показано, что они сопоставимы по суммарному выходу, временным затратам и оптической

Таблица 1

Способы синтеза цикло-L-пролилглицина

Способ	Суммарный выход, %	Временные затраты, ч	Физико-химические характеристики	
			Т.пл., °C (из спирта)	[α] ²⁰ , ° (с 1, вода)
1	60	15	207–209	–206
2	54	13	205–207	–202

чистоте конечного продукта, поэтому рационально сравнивать экономические показатели синтеза. Сравнение себестоимости ЦПГ представлено в таблице 2.

Как видно, стоимость синтеза по первой схеме в 2,5 раза ниже, чем по второй, поскольку последняя требует использования дорогостоящего катализатора на стадии циклизации. Таким образом, первая схема

Таблица 2

Сопоставление стоимости реагентов для синтеза ЦПГ по 2 способам

Схема 1				Схема 2			
Реактив	Количество, г/100 г продукта	Цена за 1 кг (л), руб.	Стоимость, руб.	Реактив	Количество, г/100 г продукта	Цена за 1 кг (л), руб.	Стоимость, руб.
Пролин	72	53 250	3 834	Пролин	100	53 250	5 325
Глицин	50,9	4 950	252	Глицин	91	4 950	450
Хлористый тионил	91,4	700	64	Хлористый тионил	127	700	89
Ди-трет-бутилпирикарбонат	180,6	18 000	3 251	Карбобензоксихлорид	167,5	15 400	2 580
Муравьиная кислота	3 246	300	974	10% Pd/C	25*	28 000#	28 000
Бутанол-2	7 792	210	1 636	N-Метилморфолин	200,4	6 120	1 226
N-Метилморфолин	147	6 120	900	Изобутилхлорформиат	119,3	21 600	2 577
Изобутилхлорформиат	79	21 600	1 706	Абсолютный этанол	1 740	500	870
Диэтиловый эфир	2 037	470	957	Диэтиловый эфир	243	470	114
Этилацетат	3 605	200	721	Этилацетат	4 453	200	891
ДМФА	392	320	125	ДМФА	1 559	320	499
Метанол	4 320	450	1 944				
Диоксан	680	300	204				
Толуол	3 900	190	741				
ИТОГО			17 310	ИТОГО			42 621

* — катализатор 10 % от массы дипептида; # — цена за упаковку.

Примечание: цены на реактивы и растворители на март 2019 г. по каталогам Alfa Aesar и ООО «Компонент-реактив».

получения ЦПГ является более рациональной и может стать основой для создания лабораторного регламента.

Как говорилось выше, ранее были изучены различные нейрорепродуктивные эффекты ЦПГ (табл. 3), но антипаркинсонические эффекты этого нейропептида были неизвестны. Для изучения антипаркинсонических свойств ЦПГ нами была использована модель каталепсии, вызываемой галоперидолом. Этот тест широко используется для выявления дофамин-позитивного действия и при исследовании антипаркинсонического действия препаратов [17].

Влияние ЦПГ на каталепсию было изучено в диапазоне доз 0,01–1,0 мг/кг в/б. Эти дозы были выбраны на основании наличия нейрорепродуктивных эффектов в других тестах (см. табл. 3). В качестве препарата сравнения был использован пираретам в дозах 100 и 200 мг/кг [27]. Было показано, что ЦПГ в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг в/б способен ослаблять каталепсию, вызванную галоперидолом (рис. 3, а). В дозах 0,01 и 1,0 мг/кг в/б ЦПГ был неактивен. Пираретам в этих же условиях был активен в дозах 100 и 200 мг/кг в/б (рис. 3, б), что соответствует данным литературы [27].

Таблица 3

Нейрорепродуктивные эффекты цикло-L-пролилглицина

Фармакологическая активность <i>in vivo</i>	Тест, животные	Активные дозы, мг/кг в/б
Ноотропная активность	Условный рефлекс пассивного избегания с амнезией, вызванной максимальным электрошоком, крысы	0,1 – 1,0
Анксиолитическая активность	Приподнятый крестообразный лабиринт, крысы	0,05 – 0,1
Антигипоксическая активность	Нормобарическая гипоксия с гиперкапнией, мыши	0,5 – 1,0
Нейропротекторная активность	Неполная глобальная ишемия головного мозга у крыс, вызванная необратимой двусторонней окклюзией общих сонных артерий, крысы	1,0 субхронически
Антидепрессивная активность	Неизбегаемое плавание по Порсолту, мыши BALB/c	1,0; 2,0 хронически

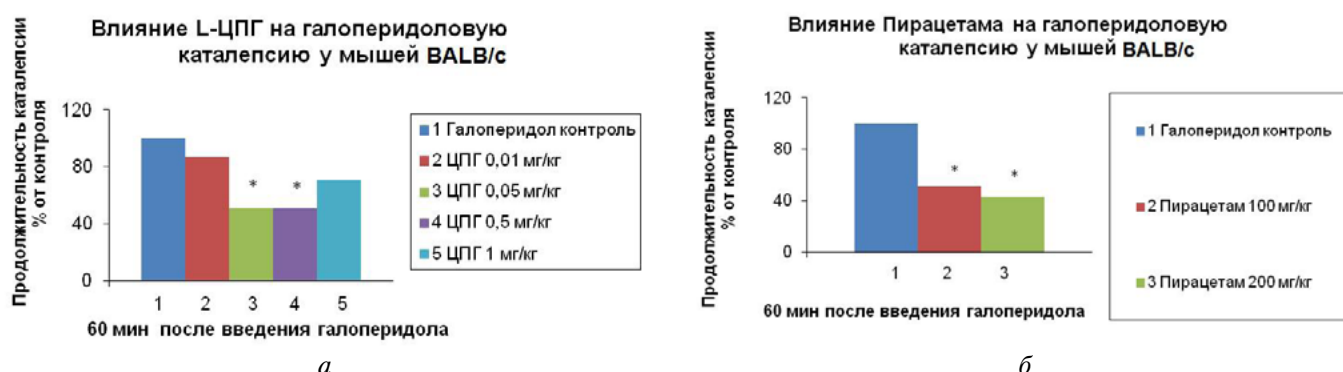


Рис. 3. Влияние пирацетама (а) и L-ЦПГ (б) на галоперидоловую каталепсию у мышей

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем (one-way ANOVA).

Полученные данные свидетельствуют в пользу наличия у ЦПГ антипаркинсонической активности аналогично пирацетаму.

Выводы

Таким образом, нами предложена схема получения ЦПГ, которая может стать основой для создания лабо-

раторного регламента, а также показана антипаркинсоническая активность этого нейропептида в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг в/б на модели галоперидоловой каталепсии.

Работа выполнена в рамках гос. задания (тема №0521-2019-0002 «Разработка новых средств и методов фармакотерапии тревожных расстройств и депрессивных состояний»).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Колясникова Ксения Николаевна
 Автор, ответственный за переписку
 e-mail: kszolotova@mail.ru
 ORCID ID: 0000-0001-6797-692X
 SPIN-код: 5682-2035
 к. б. н., н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Голубятникова Анна Константиновна
 Студент, РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва

Ребеко Алексей Геннадьевич
 SPIN-код: 1049-3528
 н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Вуколова Марина Николаевна
 SPIN-код: 2049-8491
 к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Koliasnikova Ksenia
 Corresponding author
 e-mail: kszolotova@mail.ru
 ORCID ID: 0000-0001-6797-692X
 SPIN-code: 5682-2035
 PhD, Research scientist of laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Golubyatnikova Anna
 Student of Dmitry Mendeleev University, Moscow

Rebeko Alexey
 SPIN-code: 1049-3528
 Research scientist of laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Vukolova Marina
 SPIN-code: 2049-8491
 PhD, Senior research scientist of laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Поварнина Полина Юрьевна

ORCID ID: 0000-0002-0463-2190

SPIN-код: 5498-6724

к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Кузнецова Елена Александровна

ORCID ID: 0000-0001-9228-0596

SPIN-код: 2798-7692

к. х. н., с. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Povarnina Polina

ORCID ID: 00000-0002-0463-2190

SPINcode: 5498-6724

PhD, Senior research scientist of laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Kuznetsova Elena

ORCID ID: 0000-0001-9228-0596

SPIN-code: 2798-7692

PhD, Senior research scientist of laboratory of fine organic synthesis of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

- Gudasheva TA, Boyko SS, Akparov VKh, et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. *FEBS Lett.* 1996;391:149–152.
- Гудашева Т.А., Островская Р.У., Максимова Ф.В. и др. Топологические аналоги пирacetам на основе пролина и их ноотропная активность // *Химико-фармацевтический журнал.* — 1989. — Т. 23. — № 3. — С. 276–281. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Maksimova FB, et al. Proline-based topologic pyracetam analogs and their nootropic activity. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 1989;23(3):276–281. (In Russ).]
- Guan J, Gluckman P, Yang P, et al. Cyclic glycine-proline regulates IGF-1 homeostasis by altering the binding of IGFBP-3 to IGF-1. *Sci rep.* 2014;4:4388. DOI: 10.1038/srep04388
- Гудашева Т.А., Островская Р.У., Трофимов С.С., и др. Новый эндогенный дипептид циклопролилглицин подобен пирacetаму по селективности мнемоторного эффекта // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* — 1999. — Т. 128. — № 10. — С. 411–413. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Trofimov SS, et al. New Endogenous Dipeptide Cycloprolyl-Glycine Is Similar To Piracetam By Its Mnemotropic Selectivity. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 1999;128(4) 411–413. (In Russ).]
- Гудашева Т.А., Константинопольский М.А., Островская Р.У., Середенин С.Б. Анксиолитическая активность эндогенного ноотропного пептида циклопролилглицина в тесте приподнятого крестообразного лабиринта // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* — 2001. — Т. 131. — № 5. — С. 547–550. [Gudasheva TA, Konstantinopol'skii MA, Ostrovskaya RU, Seredenin SB. Anxiolytic Activity Of Endogenous Nootropic Dipeptide Cycloprolylglycine In Elevated Plus-Maze Test. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2001;131(5):547–550. (In Russ).]
- Колясников К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А., и др. Сходство цикло-пролилглицина с пирacetамом по антигипоксическому и нейропротекторному эффектам // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* — 2012. — Т. 75. — № 9. — С. 3–6. [Kolyasnikova KN, Gudasheva TA, Nazarova GA, et al. Similarity of Cycloprolylglycine to Piracetam in Antihypoxic and Neuroprotective Effects. *Ekspperimental'naia i klinicheskaiia farmakologiya.* 2012;75(9):3–6. (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2012-75-9-3-6
- Поварнина П.Ю., Колясников К.Н., Николаев С.В., и др. Нейропептид циклопролилглицин проявляет нейропротекторную активность при системном введении на модели неполной глобальной ишемии у крыс и в условиях глутаматной нейротоксичности *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* — 2015. — Т. 160. — № 11. — С. 600–603. [Povarnina PY, Kolyasnikova KN, Nikolaev SV, et al. Neuropeptide Cycloprolylglycine Exhibits neuroprotective activity after systemic administration to rats with modeled incomplete global ischemia and in vitro modeled glutamate neurotoxicity. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2015;160(11):600–603. (In Russ).]
- Ковалев Г.И., Абдуллина А.А., Васильева Е.В., и др. Антидепрессантоподобные свойства циклопролилглицина // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* — 2018. — Т. 81. — № 11. — С. 3–6. [Kovalev GI, Abdullina AA, Vasil'eva EV, et al. Antidepressant-like properties of cycloprolylglycine. *Ekspperimental'naia i klinicheskaiia farmakologiya.* 2018;81(11):3–6. (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-11-3-6
- Ferro JN, de Aquino FL, de Brito RG, et al. Cyclo-Gly-Pro, a cyclic dipeptide, attenuates nociceptive behavior and inflammatory response in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2015;42(12):1287–1295. DOI: 10.1111/1440-1681.12480
- Гудашева Т.А., Григорьев В.В., Колясников К.Н., и др. Нейропептид циклопролилглицин является эндогенным положительным модулятором AMPA-рецепторов // *Доклады академии наук.* — 2016. — Т. 471. — № 1. — С. 106–108. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Seredenin SB, et al. Neuropeptide cycloprolylglycine is an endogenous positive modulator of AMPA receptors. *Doklady Akademii nauk.* 2016;471(1):387–389 (In Russ).] DOI: 10.7868/S0869565216310273
- Гудашева Т.А., Колясников К.Н., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Нейропептид циклопролилглицин увеличивает содержание мозгового нейротрофического фактора в нейрональных клетках // *Доклады Академии наук.* — 2016. — Т. 469. — № 4. — С. 492–495. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Antipova TA, Seredenin SB. Neuropeptide cycloprolylglycine increases the levels of brain-derived neurotrophic factor in neuronal cells. *Doklady Akademii nauk.* 2016;469(4):492–495. (In Russ).] DOI: 10.7868/S0869565216310274
- Schnabel E. Verbesserte Synthese von tert.-Butyloxycarbonyl-aminosäuren durch pH-Stat-Reaktion. *Ann Chem.* 1967;702:188–196.
- Bonora GM, Toniolo C. Sequential oligopeptides. Synthesis and characterization of the oligopeptides and a polypeptide with the repeating sequence L-norvalyl-glycyl-L-proline. *Biopolymers.* 1974;13:1055–1066. DOI: 10.1002/bip.1974.360130518
- Гудашева Т.А., Васильев Н.И., Островская Р.У., и др. Синтез и ноотропная активность пирролидино[1,2-а]диазациклоалканов // *Химико-фармацевтический журнал.* — 1996. — Т. 30. — № 9. — С. 12–17. [Gudasheva TA, Vasil'evich NI, Ostrovskaya RU, et al. Synthesis and nootropic activity of pyrrolidino[1,2-a]diazacycloalkanes. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 1996;30(9):12–17. (In Russ).]
- Bergmann M, Zervas L. Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Berichte.* 1932;65:1192–1201.
- Назарова Л.С., Розонов Ю.Б., Лихошерстов А.М., и др. Азациклоалканы. XXVII. Синтез и антиангинальная активность стереоизомеров нонахлорина // *Химико-фармацевтический журнал.* — 1984. — Т. 18. — № 12. — С. 1445–1448. [Nazarova LS, Rozonov YuB, Likhosherstov AM, et al. Azacycloalkanes. XXVII. Synthesis and antianginal activity of nonachlorine stereoisomers. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 1984;18(12):1445–1448. (In Russ).]
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / Под ред. Миронова А.Н. — М.: Гриф и К.; 2012. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. CHast' pervaya. Ed by Mironov A.N. Moscow: Grif I K.; 2012. (In Russ).]
- Ovchinnikov YuA, Ivanov VT. Conformational states and biological activity of cyclic peptides. *Tetrahedron.* 1975;31:2177–2209.
- Baldoni HA, Zamarbide GN, Enriz RD, et al. Peptide models XXIX. cis–trans Isomerism of peptide bonds: ab initio study on small peptide model compound; the 3D-Ramachandran map of formylglycinamide. *J Molec Struct (Theochem).* 2000;500:97–111.

20. Rydon HN, Smith PWG. Polypeptides. Part IV. The self-condensation of the esters of some peptides of glycine and proline. *J Chem Soc.* 1956;1956:3642–3650. DOI: 10.1039/JR9560003642
21. Manabe S, Machida H, Aihara Y, et al. Development of a diketopiperazine-forming dipeptidyl Gly-Pro spacer for preparation of an antibody–drug conjugate. *MedChemComm.* 2013;4(5):792–796. DOI: 10.1039/C3MD00075C
22. Anderson GW, Zimmerman JE, Callahan FM. Reinvestigation of the mixed carbonic anhydride method of peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1967;89:5012–5017.
23. Thajudeen H, Park K, Moon S-S, Hong IS. An efficient green synthesis of proline-based cyclic dipeptides under water-mediated catalyst-free conditions. *Tetrahedron Lett.* 2010;51(9):1303–1305. DOI: 10.1016/j.tetlet.2009.12.134
24. Nitecki DE, Halpern B, Westley JW. Simple route to sterically pure diketopiperazines. *J Org Chem.* 1968;33:864–866. DOI:10.1021/jo01266a091
25. Brenner M, Huber W. Herstellung von α -Aminosäureestern durch Alkoholyse der Methylester. *Helv. Chim. Acta.* 1953;36:1109–1115. DOI: 10.1002/hlca.19530360522
26. Smith EL, Bergmann M. The peptidases of intestinal mucosa. *J Biol Chem.* 1944;153:627–651.
27. Salam OA, Nada S. Piracetam reverses the haloperidol induced catalepsy in mice. *Turk J Med Sci.* 2011;41(4):693–699. DOI:10.3906/sag-1006-870

Влияние пептидного анксиолитика селанка на когнитивные нарушения, индуцированные алкоголем, у молодых крыс

Надорова А. В., Чернякова И. В., Колик Л. Г.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. *Актуальность.* Многочисленные экспериментальные и клинические данные подтверждают уязвимость мозга подростков к воздействию этанола и долгосрочные когнитивные последствия острой алкогольной интоксикации. Отечественный препарат селанк синтезирован на основе модификации структуры эндогенного регуляторного пептида тафтсина и разработан в качестве анксиолитического средства с активирующим действием на мнестические и когнитивные функции. *Цель.* Изучение влияния селанка на этанол-индуцированное нарушение кратковременной памяти у молодых крыс. *Методы.* В опытах *in vivo* исследовано влияние селанка в эффективной анксиолитической дозе 0,3 мг/кг (в/б, 2-кратное введение) на обусловленное этанолом в дозе 3,0 г/кг (в/б, 2-кратное введение) нарушение памяти в тесте «распознавание нового объекта» у беспородных крыс-самцов в возрасте 5 недель. *Результаты.* Селанк препятствовал этанол-индуцированному нарушению кратковременной непространственной памяти у молодых крыс, статистически значимо увеличивая индекс дискриминации ($p < 0,01$) и индекс распознавания ($p < 0,01$) нового стимульного объекта. Препарат *per se* не оказывал статистически значимого влияния на процесс консолидации памяти у крыс, не подверженных действию алкоголя. *Заключение.* Полученные данные позволяют предположить корректирующее действие гептапептидного аналога тафтсина на гиппокамп-зависимые когнитивные нарушения, индуцированные алкоголем.

Ключевые слова: этанол; селанк; кратковременная память; молодые крысы

Для цитирования:

Надорова А.В., Чернякова И.В., Колик Л.Г. Влияние пептидного анксиолитика селанка на когнитивные нарушения, индуцированные алкоголем, у молодых крыс // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 3. – С. 27–33. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10052

The effect of peptide anxiolytic selank on cognitive impairment induced by acute alcohol in adolescent rats

Nadorova AV, Chernyakova IV, Kolik LG
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. *Background.* Numerous experimental and clinical data confirm the vulnerability of the adolescent brain to ethanol and the long-term cognitive effects of acute alcohol intoxication. Selank was synthesized on the base of modification of the endogenous regulatory peptide tuftsins and developed as an anxiolytic with the activating effect on mental and cognitive functions. *The aim of this work was to study the selank effects on ethanol-induced impairment in short-term memory in young rats. Methods.* The effect of selank in an effective anxiolytic dose (0.3 mg/kg, i.p., twice) on ethanol-induced (3.0 g/kg, i.p., twice) memory impairment was registered in the "Novel object recognition" test in male PD35 aged rats. *Results.* Selank prevented ethanol-induced disturbance of short-term non-spatial memory in adolescent rats, significantly increasing the discrimination index ($p < 0.01$) and the recognition index ($p < 0.01$) of the new stimulus object. Selank *per se* has no statistically significant effect on memory consolidation phase in rats not exposed to alcohol. *Conclusion.* The obtained data suggest a corrective effect of heptapeptide analogue of tuftsins on hippocampus-dependent cognitive impairment induced by alcohol.

Keywords: ethanol; cognitive impairment; selank; adolescent rats

For citations:

Nadorova AV, Chernyakova IV, Kolik LG. The effect of peptide anxiolytic selank on cognitive impairment induced by acute alcohol in adolescent rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;3:27–33. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10052

Введение

Встречающийся в англоязычной литературе термин «binge drinking» подразумевает определённый паттерн алкогольного поведения, характеризующийся потреблением большого количества алкоголя за непродолжительный отрезок времени, что представляет серьёзную социальную и медико-биологическую проблему [1], поскольку является доминирующим типом злоупотребления алкоголем у подростков и непосредственно влияет на когнитивные функции у людей и животных [2, 3]. Нейроны префронтальной области чувствительны к воздействию этанола в период нейронального развития, поэтому злоупотребление алкоголем может существенно ухудшить траекторию социального и психического здоровья подростков

[4, 5]. Считается, что именно возраст является критической точкой в неспособности восстановить повреждённые алкоголем когнитивные функции, что подтверждается нейроанатомическими исследованиями, связывающими эпизодическое «пьянство» («binge drinking») со снижением белого вещества в мозолистом теле у подростков [3, 6].

Сегодня имеются убедительные экспериментальные доказательства существования этанол-индуцированных нарушений в глутаматергической нейротрансмиссии и изменений синаптической пластичности в гиппокампе. По данным протеомного анализа, 13 белков по-разному реагировали на этанол в дозе 5,0 г/кг, в/б, в зависимости от возраста животных. Оказалось, что большинство из этих белков участвует в нейротрансмиссии, и экспрессия их мРНК значительно

но снижается у молодых крыс, получающих этанол, что позволяет сделать авторам вывод о вызываемых этанолом изменениях в экспрессии фосфопротеинов в гиппокампе, которые могут увеличить риск нейродегенеративных нарушений, особенно когда действие алкоголя начинается в юном возрасте [7]. *Silvestre de Ferron B, et al.* (2015) сообщили, что две экспозиции с этанолом (3 г/кг, в/б, через 9 ч), повышающие содержания этанола до 2 г/л в крови, уже через 48 ч вызывали уменьшение синаптического сигнала пластичности, связанного с обучением и памятью (долгосрочной синаптической депрессии, LTD), на срезах гиппокампа у молодых крыс [2]. Пока остаётся неясным механизм повреждения LTD под действием острой алкогольной интоксикации, однако получены данные об увеличении субъединиц GluN2B ионотропных глутаматных NMDA-рецепторов на фоне «binge drinking», что в свою очередь вызывает дисбаланс с субъединицами GluN2A в глутаматергической передаче, приводящей к блокаде LTD в гиппокампе и к ухудшению памяти [8].

В целом, представленные данные подтверждают уязвимость мозга подростков к воздействию этанола и долгосрочные когнитивные последствия алкогольной интоксикации. Распространённость такого рода нарушений определяет актуальность поиска средств профилактики и фармакологической коррекции. Большое значение в адекватной регуляции разных форм патологического поведения и мнестических функций в настоящее время придаётся биологически активным пептидам [9–12].

Отечественный препарат Селанк синтезирован на основе эндогенного регуляторного пептида тафтсина в ИМГ РАН и разработан в качестве анксиолитического средства для терапии генерализованных тревожных расстройств в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В.Закусова», Москва (рис. 1).

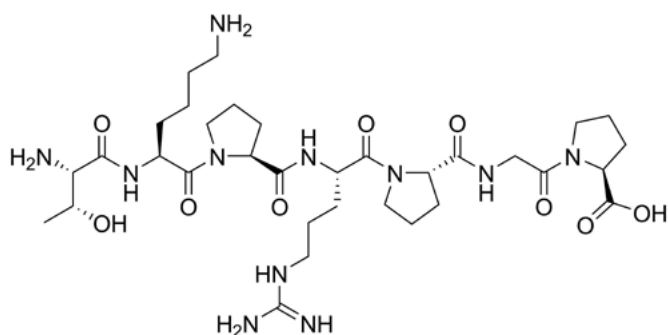


Рис. 1. Структурная формула селанка

В отличие от бензодиазепиновых транквилизаторов, анксиолитическое действие селанка сочетается с активирующим действием на мнестические и когнитивные функции мозга [13, 14]. При экспериментальной оценке возможности использования селанка в наркологической практике при моделировании ассоциированных с алкоголизмом нарушений ЦНС в опытах *in vivo* доказана эффективность селанка в

отношении индуцированной отменой этанола тревожной реакции [15] и положительное влияние на восстановление кратковременной памяти у «старых» крыс, потреблявших в течение длительного времени раствор этанола [16]. В настоящее время механизм центрального действия селанка преимущественно связывают с изменением функционального состояния серотонинергической системы [17] и влиянием на ГАМК-ергическую систему [18]. Наряду с этим в опытах *ex vivo* селанк повышал на 23 % плотность мест связывания селективного антагониста [G-3H]МК-801 с ионотропными NMDA-рецепторами у мышей [19]. Данные о возможном действии селанка на функции памяти после острой алкогольной интоксикации в настоящее время отсутствуют. Цель работы — оценка влияния пептидного аналога тафтсина селанка на этанол-индуцированное нарушение кратковременной гиппокамп-зависимой памяти у молодых крыс.

Материалы и методы

Животные. Эксперименты выполнены на молодых беспородных крысах-самцах в возрасте 5 недель ($n = 36$, питомник Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Московская обл.). Животных содержали в индивидуальных клетках ТЗ в условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при регулируемом световом режиме 12ч/12ч (свет/темнота) и постоянной температуре (21–23 °С) со свободным доступом к воде и гранулированному корму (ГОСТ Р 50258-92) в течение 10 сут. до начала тестирования. Организация и проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России №199 от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. №51. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва.

Препараты. Селанк (Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro) — субстанция, в анксиолитической дозе 0,3 мг/кг (ИМГ РАН), этанол 20 % в дозе 3,0 г/кг и воду для инъекций в качестве контроля вводили в/б в эквивалентных объёмах согласно схеме эксперимента (рис. 2). Выбор дозы селанка для проведения исследований основан на ранее полученных данных [13].

Препараты вводили согласно схеме:

- «Контроль» — вода для инъекций + через 30 мин вода для инъекций; $n = 8$;
- «Селанк» — Селанк 0,3 мг/кг + через 30 мин вода для инъекций; $n = 8$;

Результаты исследований и обсуждение

Изучено действие гептапептидного аналога тафтинина селанка, широко используемого в клинической практике в качестве быстродействующего пептидного анксиолитика с ноотропными свойствами, на алкоголь-индуцированные нарушения кратковременной памяти у молодых беспородных крыс-самцов.

При оценке интереса к одинаковым предметам (A1 и A2) во вторую фазу эксперимента (знакомство с объектами) показано, что животные не проявляли предпочтения ни к одному из объектов как в популяции, так и в сформированных группах (рис. 3 А, Б и В).

Этанол при 2-кратном введении после знакомства с новыми объектами заметно ослаблял процесс запоминания, о чём свидетельствует статистически значимое снижение индекса дискриминации и индекса распознавания нового объекта по сравнению с контрольной группой (рис. 4 А, Б и В). Представленная в работе модернизированная и адаптированная методика оценки повреждающего действия этанола («binge-like drinking») подтверждает в опытах *in vivo* данные клинических наблюдений, в которых доказано, что у подростков зрительная память более чувствительна к нарушению алкоголем, чем рабочая память [23].

Установлено, что селанк в дозе 0,3 мг/кг (в/б, 2-кратное введение) препятствует этанол-индуцированному нарушению кратковременной непростран-

ственной памяти у молодых крыс в тесте «распознавание нового объекта», статистически значимо увеличивая индекс дискриминации и индекс распознавания нового стимульного объекта (рис. 4 Б, В).

Полученные данные согласуются с результатами наблюдений действия селанка на восстановление непространственной памяти у крыс, подвергнутых длительной хронической алкогольной интоксикации, и свидетельствующих о выраженном влиянии препарата на возрастные нарушения памяти, сопровождающиеся хроническим потреблением алкоголя [16].

Ноотропная активность селанка, по-видимому, определяется его действием на серотонинергическую систему. Во-первых, препарат при однократном введении усиливал метаболизма серотонина в гипоталамусе и каудальном отделе ствола мозга и улучшал у животных стабилизацию следа памяти в течение 30 дней, то есть в период фазы консолидации улучшал процессы сохранения памятного следа. [13]. Во-вторых, согласно нейрохимическим исследованиям, выполненным на крысах со сформированной в течение 8 мес. алкогольной зависимостью, селанк препятствовал индуцированному отменой этанола повышению уровня серотонина во фронтальной коре, гипоталамусе и миндалине [17]. С другой стороны, показана способность селанка оказывать модулирующее действие на функционирование мозгового нейротрофического фактора (BDNF). Повышение экспрессии

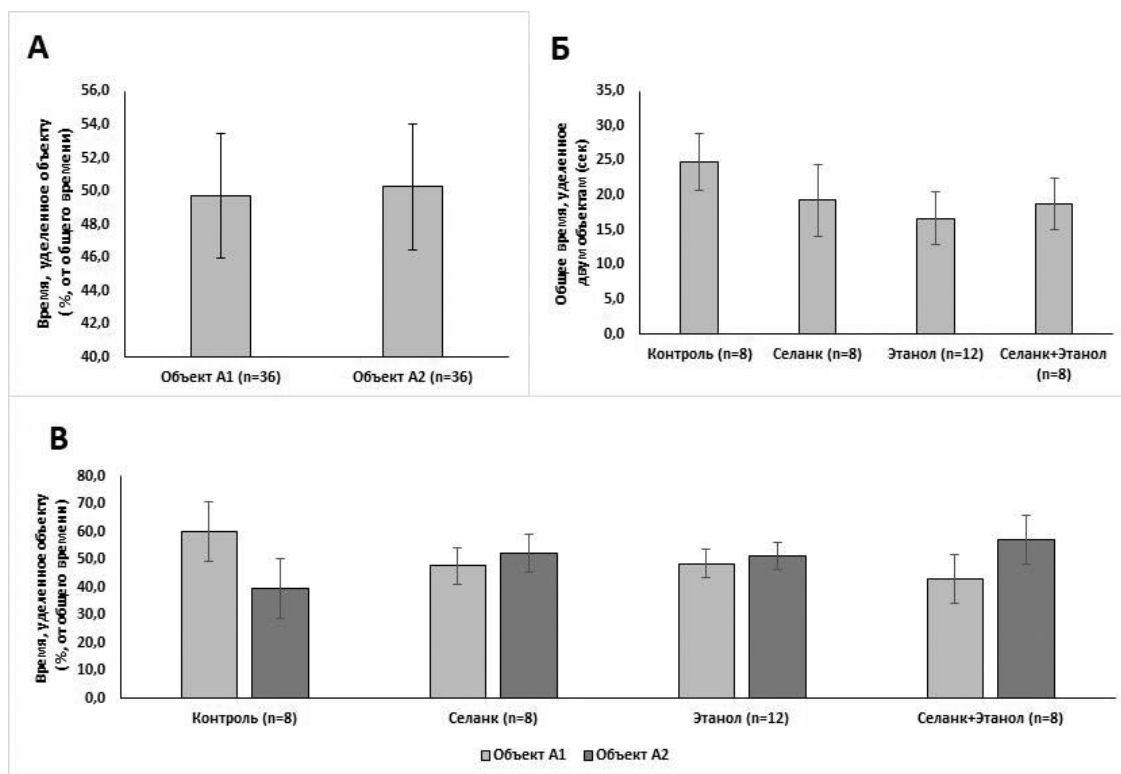


Рис. 3. Время спонтанного исследования объектов у молодых крыс во 2-ю фазу эксперимента «Знакомство с объектами» ($M \pm SEM$):

А – Процент предпочтения между двумя объектами (A1 и A2) в исследуемой популяции ($n = 36$); Б – Общее время, уделенное двум объектам в каждой группе; В – Процент предпочтения между двумя объектами (A1 и A2) в каждой группе

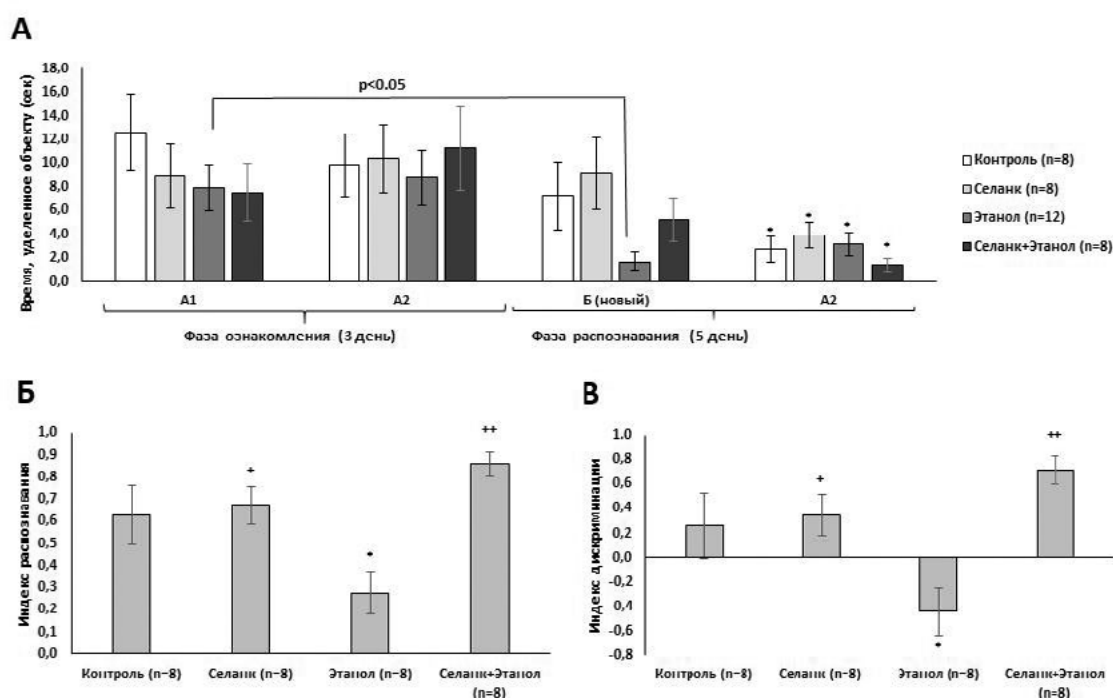


Рис. 4. Действие селанка на когнитивные функции молодых крыс, повреждённые этанолом ($M \pm SEM$):

А — Время, уделённое каждому объекту во время 2-й и 3-й Фазы эксперимента (сек). * — $p < 0,05$ — по отношению к соответствующей группе (A2, между 3-м и 5-м днём эксперимента), согласно Т-критерию для зависимых переменных; Б — Индекс распознавания. ANOVA $F(3, 28) = 6,2691$, $p = 0,00216$, * — $p < 0,05$ — по отношению к группе «Контроль», *; + — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ — по отношению к группе «Этанол» согласно критерию Дункана; В — Индекс дискриминации. ANOVA $F(3, 28) = 6,2691$, $p = 0,00216$, * — $p < 0,05$ — по отношению к группе «Контроль», *; + — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ — по отношению к группе «Этанол» согласно критерию Дункана

мРНК BDNF через 3 ч и увеличение содержания белка BDNF в гиппокампе через 24 ч после интраназального введения intactным крысам линии Wistar свидетельствуют о стимуляции селанком экспрессии нейротрофического фактора в клетках гиппокампа [24]. Напротив, при моделировании алкогольной абстиненции у беспородных крыс, потреблявших раствор этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 30 недель, селанк препятствовал этанол-индуцированному повышению содержания белка BDNF в гиппокампе и фронтальной коре [16].

Принимая во внимание тот факт, что этанол вызывает сенсibilизацию нейронов биогенных аминов, способствующих развитию психических заболеваний, а BDNF предотвращает индуцированную этанолом повышенную чувствительность к эксайтотоксическому действию N-метил-D-аспартата в культуре кортикальных нейронов [25], можно предположить терапевтическую эффективность селанка как синтетического

аналога тафтсина в предупреждении и фармакотерапии различных нарушений ЦНС, обусловленных острой и хронической алкогольной интоксикацией у пациентов разных возрастных групп.

Работа выполнена в рамках государственного задания (проект № 0521-2019-0006).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Участие авторов. Надорова А.В. — выполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов, написание текста; Чернякова И.В. — выполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов, написание текста; Колик Л.Г. — постановка задачи, написание текста, редактирование, финальное утверждение.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Надорова Анна Владимировна
Автор, ответственный за переписку
 e-mail: av-nadorova@mail.ru
 ORCID ID: 0000-0002-0463-2190
 н. с. лаборатории фармакологической
 регуляции состояний зависимости, ФГБНУ
 «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»,
 Москва

Nadorova Anna
Corresponding author
 e-mail: av-nadorova@mail.ru
 ORCID ID: 0000-0002-0463-2190
 research scientist Laboratory of Pharmacological
 Regulation of Alcohol and Drug Addiction, FSBI
 «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Чернякова Ирина Владимировна
 к. м. н., в. н. с. лаборатории фармакологической
 регуляции состояний зависимости, ФГБНУ
 «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»,
 Москва

Chernyakova Irina
 PhD, leading researcher Laboratory of Pharma-
 cological Regulation of Alcohol and Drug Addic-
 tion, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology»,
 Moscow

Колик Лариса Геннадьевна
 ORCID ID: 0000-0002-9847-8058
 д. б. н., профессор РАН, руководитель
 лаборатории фармакологической регуляции
 состояний зависимости, ФГБНУ «НИИ
 фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kolik Larisa
 ORCID ID: 0000-0002-9847-8058
 PhD, prof. RAS, head Laboratory of Pharmaco-
 logical Regulation of Alcohol and Drug Addic-
 tion, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology»,
 Moscow

Литература / References

1. Rolland B, Naassila M. Binge drinking: current diagnostic and therapeutic issues. *CNS Drugs*. 2017 Mar;31(3):181–186. DOI: 10.1007/s40263-017-0413-4
2. Silvestre de Ferron B, Bennouar KE, Kervin M, et al. Two binges of ethanol a day keep the memory away in adolescent rats: key role for GLUN2B subunit. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015 Aug 6;19(1). pii: pyv087. DOI: 10.1093/ijnp/pyv087
3. Smith KW, Gierski F, Andre J, et al. Altered white matter integrity in whole brain and segments of corpus callosum, in young social drinkers with binge drinking pattern. *Addict Biol*. 2017 Mar;22(2):490–501. DOI: 10.1111/adb.12332
4. Taren AA, Venkatraman V, Huettel SA. A parallel functional topography between medial and lateral prefrontal cortex: evidence and implications for cognitive control. *J Neurosci*. 2011 Mar 30;31(13):5026–5031. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5762-10.2011
5. Crone EA, Bullens L, van der Plas EA, et al. Developmental changes and individual differences in risk and perspective taking in adolescence. *Dev Psychopathol*. 2008 Fall;20(4):1213–1229. DOI: 10.1017/S0954579408000588
6. McQueeney T, Schweinsburg BC, Schweinsburg AD, et al. Altered white matter integrity in adolescent binge drinkers. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009 Jul;33(7):1278–1285. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2009.00953.x
7. Contreras A, Morales L, Tebourbi A, et al. Age-Dependent Effects of Acute Alcohol Administration in the Hippocampal Phosphoproteome. *Chem Res Toxicol*. 2017 Dec 18;30(12):2165–2173. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.7b00260
8. Drissi I, Deschamps C, Fouquet G, et al. Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2. *Addict Biol*. 2019 May 6:e12760. DOI: 10.1111/adb.12760
9. Kovács GL, Bohus B, Versteeg DH, et al. Effect of oxytocin and vasopressin on memory consolidation: sites of action and catecholaminergic correlates after local microinjection into limbic-midbrain structures. *Brain Res*. 1979 Oct 19;175(2):303–314.
10. Gudashva TA, Boyko SS, Akparov VKh, et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. *FEBS Lett*. 1996 Aug 5;391(1-2):149–152. DOI:10.1016/0014-5793(96)00722-3
11. Ашмарин И.П., Королева С.В., Мясоедов Н.Ф. Синактоны – функционально связанные комплексы эндогенных регуляторов // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2006. – Т. 69. – № 5. – С. 3–6. [Ashmarin IP, Koroleva SV, Myasoedov NF. Sinaktomy – funktsional'no svyazanny'e komplekсы' e'ndogenny'x regul'yatorov. *E'ksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2006;69(5):3–6. (In Russ).]
12. Vyunova TV, Andreeva LA, Shevchenko KV, Myasoedov NF. An integrated approach to study the molecular aspects of regulatory peptides biological mechanism. *J Labelled Comp Radiopharm*. 2019 Jul 20. DOI: 10.1002/jlcr.3785
13. Семенова Т.П., Козловский И.И., Захарова Н.М., Козловская М.М. Оптимизация процессов обучения и памяти в эксперименте с помощью селанка // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2010. – Т. 73. – № 8. – С. 2–5. [Semenova TP, Kozlovskij II, Zakharova NM, Kozlovskaya MM. Optimizatsiya processov obucheniya i pamyati v e'ksperimente s pomoshh'yu selanka. *E'ksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2010;73(8):2–5. (In Russ).]
14. Козловский И.И., Белозерцев Ф.Ю., Андреева Л.А., Козловская М.М. Протективное действие селанка при нарушении мнестических функций, вызванном в эксперименте фармакологической блокадой синтеза белка // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2013. – Т. 76. – № 12. – С. 3–7. [Kozlovskij II, Belozercev FYu, Andreeva LA, Kozlovskaya MM. Protektivnoe deystvie selanka pri narushenii mnestichestkikh funktsij, vy'zvanom v e'ksperimente farmakologicheskoy blokadoj sinteza belka. *E'ksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2013;76(12):3–7. (In Russ).]
15. Колик Л.Г., Надорова А.В., Козловская М.М. Эффективность пептидного анксиолитика селанка при моделировании синдрома отмены у крыс с устойчивой алкогольной мотивацией // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2014. – Т. 157. – № 1. – С. 61–65. [Kolik LG, Nadorova AV, Kozlovskaya MM. Efficacy of peptide anxiolytic selank during modeling of withdrawal syndrome in rats with stable alcoholic motivation. *Bull Exp Biol Med*. 2014;157(1): 52–55. (In Russ).] DOI: 10.1007/s10517-014-2490-4
16. Колик Л.Г., Надорова А.В., Антипова Т.А., и др. Пептидный аналог тафтсина селанк защищает от этанол-индуцированного нарушения памяти, регулируя содержание BDNF в гиппокампе и префронтальной коре у крыс // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2019 – Т. 167. – № 5. – С. 581–585. [Kolik LG, Nadorova AV, Antipova TA, et al. Peptidny'j analog taftsina selank zashchishhaet ot

e'tanol-inducirovannogo narusheniya pamyati, reguliruya sodержanie BDNF v gippokampe i prefrontal'noj kore u kry's. *Bull Exp Biol Med.* 2019; 167(5):581–585. (In Russ).]

17. Надорова А.В., Колик Л.Г., Клодт П.М., и др. Соотношение анксиолитического действия селанка и уровня серотонина в отдельных структурах мозга при моделировании алкогольной абстиненции у крыс // *Нейрохимия*. — 2014. — Т. 31. — № 2. — С. 147. [Nadorova AV, Kolik LG, Klodt PM, et al. The relationship between the anxiolytic action of selank and the level of serotonin in brain structures during the modeling of alcohol abstinence in rats. *Neurochemical journal.* 2014;8(2):115–120. (In Russ).] DOI: 10.1134/S1819712414020081

18. Vyunova TV, Andreeva L, Shevchenko K, Myasoedov N. Peptide-based Anxiolytics: The Molecular Aspects of Heptapeptide Selank Biological Activity. *Protein Pept Lett.* 2018;25(10):914–923. DOI: 10.2174/0929866525666180925144642

19. Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., и др. Сравнение эффектов пептида Селанк на глутаматные рецепторы и поведение при разных путях его введения мышам BALB/С и С57BL/6. Сб. материалов Всеросс. Конф. молодых ученых с международным участием «Достижения современной фармакологической науки» и Школе фармакологов и клинических фармакологов, Рязань, РязГМУ, 22–23 октября 2015. — С. 52–55 [Vasil'eva EV, Kondrakhin EA, Salimov RM, et al. Sravnenie e'ffektov peptida Selank na glutamatny'e receptory i povedenie pri razny'x putyax ego vvedeniya my'sham BALB/C i S57BL/6. Sb. materialov Vseross. Konf. molody'x ucheny'x s mezhdunarodny'm uchastiem «Dostizheniya

sovremennoj farmakologicheskoy nauki» i Shkole farmakologov i klinicheskix farmakologov, Ryazan', RyazGMU, 2015 22–23 okt:52–55. (In Russ).]

20. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process.* 2012 May;13(2):93–110. DOI: 10.1007/s10339-011-0430-z

21. Aggleton JP, Albasser MM, Aggleton DJ, et al. Lesions of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition. *Behav Neurosci.* 2010 Feb;124(1):55–68. DOI: 10.1037/a0018320

22. Burke SN, Wallace JL, Nematollahi S, et al. Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. *Behav Neurosci.* 2010 Oct;124(5):559–573. DOI: 10.1037/a0020893

23. Vinader-Caerols C, Talk A, Montañés A, et al. Differential Effects of Alcohol on Memory Performance in Adolescent Men and Women with a Binge Drinking History. *Alcohol Alcohol.* 2017 Sep 1;52(5):610–616. DOI: 10.1093/alcalc/agx040

24. Иноземцева Л.С., Карпенко Е.А., Долотов О.В., и др. Пептид селанк регулирует экспрессию BDNF в гиппокампе крысы *in vivo* при интраназальном введении // *Доклады Академии наук*. — 2008. — Т. 421. — № 6. — С. 842–844. [Inozemceva LS, Karpenko EA, Dolotov OV, et al. Intranasal administration of the peptide Selank regulates BDNF expression in the rat hippocampus *in vivo*. *Dokl Biol Sci.* 2008 Jul-Aug;421:842–844. (In Russ).]

25. Crews FT, Waage HG, Wilkie MB, Lauder JM. Ethanol pretreatment enhances NMDA excitotoxicity in biogenic amine neurons: protection by brain derived neurotrophic factor. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999 Nov;23(11):1834–1842.

Сравнительная фармакокинетика и фармакодинамика ноопепта, его активного метаболита цикло-*L*-пролилглицина и пирацетама

Бойко С. С., Колясникова К. Н., Жердев В. П.

ВФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. При изучении экспериментальной фармакокинетики пептидного аналога пирацетама – лекарственного препарата ноопепт, представляющего собой этиловый эфир фенилацетил-*L*-пролилглицина, в качестве его активного метаболита был идентифицирован цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ). Позднее ЦПГ был обнаружен как эндогенное соединение в плазме и мозге крыс. Было показано, что фармакокинетические параметры ЦПГ имеют существенные отличия от ноопепта, а также от его прототипа – пирацетама по более продолжительному периоду полувыведения и лучшей биодоступности для мозга. Показано, что спектры ноотропной и анксиолитической активности ЦПГ и пирацетама совпадают. Для пирацетама были также выявлены антигипоксический и нейропротективный эффекты, которые не были изучены у ЦПГ. Кроме того, при изучении фармакологической активности были установлены значительные различия эффективных доз сравниваемых лекарственных веществ, которые нельзя было объяснить в полной мере различиями их фармакокинетики. В данной работе представлены результаты изучения антигипоксического и нейропротективного эффектов ЦПГ в сравнении с пирацетамом в сопоставлении с фармакокинетическими параметрами изучаемых соединений.

Ключевые слова: цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ); ноопепт; пирацетам; фармакокинетические параметры; фармакологическая активность

Для цитирования:

Бойко С.С., Колясникова К.Н., Жердев В.П. Сравнительная фармакокинетика и фармакодинамика ноопепта, его активного метаболита цикло-*L*-пролилглицина и пирацетама // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 3. – С.34–38. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10053

Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of noopept, its activity metabolite cyclo-*L*-prolylglycine and piracetam

Boyko SS, Kolyasnikova KN, Zherdev VP

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. While studying of experimental pharmacokinetics of the peptide analogues piracetam noopept – N-phenylacetyl-*L*-prolyl-glycine ethyl ester, was found the active metabolite that identified as cyclo-*L*-prolylglycine (CPG). At that time CPG was detected as the endogenous compound in plasma and brain. It was found that the pharmacokinetic parameters of CPG have the better characteristics than noopept and its prototype piracetam for the longer period of eliminations and the best bioavailability for the brain. It is found that the spectrum of nootropic and anxiolytic activity CPG and piracetam are composed. For piracetam also found antihypoxic and neuroprotective effects that were not investigated for CPG. Furthermore while studying of the pharmacological activity was found significant differences in the effective doses of comparable drugs that were not described by their different pharmacokinetics. This paper presents the results of comparative study of the antihypoxic and neuroprotective effects of CPG and piracetam in comparison with pharmacokinetic parameters of studied compounds.

Keywords: cyclo-*L*-prolylglycine (CPG); noopept; piracetam; pharmacokinetics parameters; pharmacological activity

For citations:

Boyko SS, Kolyasnikova KN, Zherdev VP. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of noopept, its activity metabolite cyclo-*L*-prolylglycine and piracetam. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;3:34–38. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10053

Введение

В начале 80-х годов в отделе химии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Москва) была высказана гипотеза о существовании неизвестного нейропептида, являющегося эндогенным регулятором процессов памяти, воздействующего на гипотетические ноотропные рецепторы [1]. В связи с этим разрабатывалось фундаментальное направление исследований по созданию пролинсодержащих аналогов классического ноотропного средства пирацетама, в результате которых был синтезирован цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ), являющийся предполагаемым прообразом пирацетама. Было показано, что ЦПГ, подобно пирацетаму, улучшает когнитивные функции [2, 3]. Кроме того, ЦПГ проявляет сходство с пирацетамом и по другим видам фармакологической активности [4, 5]

при системном введении в эффективных дозах – 0,5–1,0 мг/кг, которые значительно меньше эффективных доз пирацетама. Позднее ЦПГ был обнаружен в плазме и мозге крыс при изучении фармакокинетики пептидного аналога пирацетама ноопепта – этилового эфира *N*-фенилацетил-*L*-пролилглицина в качестве его активного метаболита, а также как эндогенное соединение [6, 7]. Структура ЦПГ была идентифицирована методом ВЭЖХ с масс-спектрометрией, определено его количественное содержание, рассчитаны основные фармакокинетические параметры в плазме и мозге крыс после введения ноопепта [8–10]. Установлено, что фармакокинетические параметры ЦПГ выгодно отличаются от параметров ноопепта по энзиматической устойчивости и по сравнению с пирацетамом более высокой биодоступностью к ткани мозга крыс [8–10, 11]. Однако значительное различие в эффективных дозах

сравниваемых препаратов нельзя было объяснить в полной мере с позиций их фармакокинетики. При изучении фармакологической активности было показано сходство ЦПГ с пирацетамом по ноотропному и анксиолитическому эффектам [3, 4], при этом антигипоксическая активность ЦПГ не была изучена, нейропротективная активность была изучена недостаточно. Кроме того, не проводилось сопоставление этих эффектов ЦПГ с его фармакокинетикой. В связи с выше изложенным целью данной работы явилось изучение фармакокинетики ЦПГ, как метаболита ноопепта, и его антигипоксического и нейропротективного эффектов в сравнении с пирацетамом, а также выяснение возможной роли фармакокинетики изучаемых соединений в проявлении их фармакологических эффектов.

Методы исследования

Исследование фармакокинетики и метаболизма ноопепта проводили на беспородных крысах-самцах массой 180–220 г после системного введения водного раствора субстанции ноопепта в дозе 10 мг/кг. Животных декапитировали в дискретные интервалы времени (через 5, 10, 15, 20, 30 мин и 1, 2, 4 ч) после введения ноопепта, собирали кровь и извлекали мозг, проводили экстракцию и пробоподготовку опытных образцов. Идентификацию ЦПГ, количественное определение ЦПГ в плазме и мозге крыс проводили методом ВЭЖХ с масс-спектрометрией [8–10]. На основе полученных данных рассчитывали основные фармакокинетические параметры ноопепта и ЦПГ.

Антигипоксический и нейропротективный эффекты ЦПГ оценивали с использованием соответствующих методов [5, 7].

Результаты и обсуждение

Ноопепт был отобран из ряда синтезированных ацилпролил-производных аналогов пирацетама для продвижения в качестве ноотропного препарата на основании его высокой активности и синтетической доступности. При этом необходимым условием является изучение фармакокинетики и биотрансформации разрабатываемого соединения с целью его безопасного и эффективного применения. На рис. 1 представлены

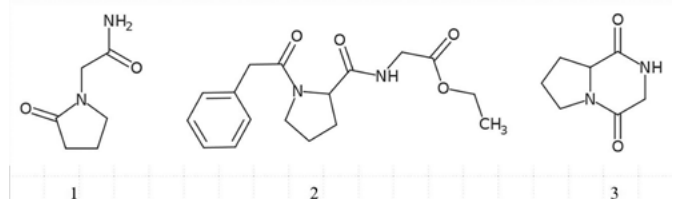


Рис. 1. Структурные формулы:

1 — пирацетам — 2-оксо-1-пирролидин-ацетамид; 2 — ноопепт — этиловый эфир *N*-фенилацетил-*L*-пролилглицина; 3 — цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ)

структурные формулы препарата сравнения пирацетама и изучаемых соединений.

При изучении биотрансформации ноопепта [8–10] были обнаружены и идентифицированы с использованием стандартов-свидетелей метаболиты: М1 — *N*-фенилацетил-*L*-пролилглицин, М2 — *N*-фенилацетил-*L*-пролин, М4 — этокси-пролилглицин, М5 — этокси-глицин и М6 — цикло-*L*-пролилглицин, из которых наибольший интерес представляет активный метаболит циклической структуры — цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ), который определялся в плазме крови крыс в более высокой концентрации и значительно более продолжительное время — в течение 4 ч после введения ноопепта, период полувыведения которого составлял 25 мин.

В результате пресистемной элиминации ноопепта происходит отщепление фенилацетильного радикала от его молекулы с образованием *L*-пролилглицина, который превращается в циклическую форму — ЦПГ — метаболит М 6 (рис. 2).

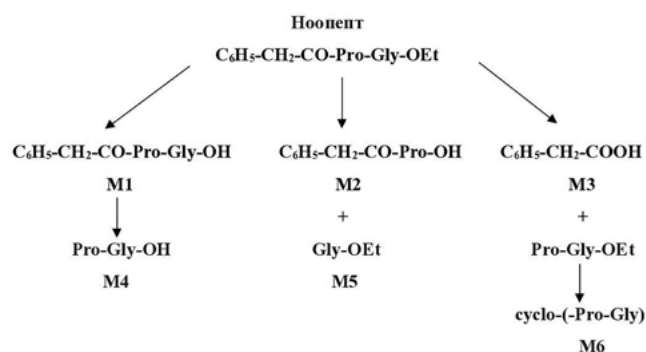


Рис. 2. Схема метаболизма ноопепта

ЦПГ как метаболит ноопепта, был впервые обнаружен нами в плазме и мозге крыс с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС, установлена его структура, изучена фармакокинетика и рассчитаны основные фармакокинетические параметры в сравнении с аналогичными параметрами ноопепта, которые представлены в таблице. Кроме того, в таблице представлены параметры пирацетама [11].

Из представленных в таблице данных видно, что фармакокинетические параметры ЦПГ значительно отличаются от таковых ноопепта — более продолжительным периодом полувыведения как в плазме, так и в мозге крыс, что, по-видимому, связано с его циклической структурой, которая более устойчива к энзиматическому воздействию по сравнению с линейными дипептидами [12]. Важно подчеркнуть, что величина площади под фармакокинетической кривой как ноопепта, так и ЦПГ больше в мозге по сравнению с плазмой, что указывает на их хорошую абсорбцию тканью мозга и прониканию через ГЭБ, возможно, благодаря специфическому связыванию с переносчиками РЕРТ-2, что обуславливает высокую

Таблица

Фармакокинетические параметры ноопепта и ЦПГ в плазме крови и мозге крыс после системного введения ноопепта в дозе 10 мг/кг в сравнении с пирацетамом в дозе 200 мг/кг

Параметры, Размерность	Ноопепт, плазма	Ноопепт, мозг	ЦПГ, плазма	ЦПГ, мозг	Пирацетам, плазма	Пирацетам, мозг
$C_{\max}$, МКГ/МЛ	0,820±0,28	1,289±0,15	0,72±0,078	1,35		
$T_{\max}$, ч	0,25±0,15	0,50±0,25	0,50±0,25	0,75±0,25	0,45–1,00	2,00–3,00
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$, МКГ/МЛ×ч	0,31±0,08	0,50±0,09	3,78±0,75	5,22±0,87		
$T_{1/2}$, ч	0,19±0,08	0,215±0,05	3,99±0,67	2,87±0,65	1,67	1,87
$K_{\text{мозг/плазма}}$		1,61		1,38		1,00

Примечание: $C_{\max}$ — максимальная концентрация соединений в плазме и мозге крыс; $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ — площадь под фармакокинетической кривой; $T_{1/2}$ — период полувыведения, за который выводится 50 % ЛВ; $K_{\text{мозг/плазма}}$ — соотношение концентраций в мозге и плазме, позволяет оценить биодоступность препарата к ткани мозга. Для пирацетама из-за большой разницы доз сравниваемых препаратов приводятся только дозо-независимые параметры.

биодоступность к ткани мозга крыс. При сравнении фармакокинетических параметров ЦПГ с пирацетамом следует отметить, что, период полувыведения ЦПГ в плазме крови и мозге крыс продолжительнее по сравнению с аналогичным параметром пирацетама, который составляет 1,67 ч для плазмы и 1,87 ч для мозга [11], что указывает на большую энзиматическую устойчивость ЦПГ к воздействию ферментов плазмы и мозга крыс, возможно, связанную с различной активностью пептидаз к этим соединениям [13]. В то же время, ЦПГ намного быстрее проникает через ГЭБ по сравнению с пирацетамом, обнаруживается в мозге крыс в максимальной концентрации через 45 мин после введения ноопепта, в то время, как $C_{\max}$ пирацетама в мозге экспериментальных животных достигается значительно медленнее — в течение 2–3 ч после введения. Кроме того, ЦПГ проявляет более высокую тканевую биодоступность к мозгу крыс по сравнению с пирацетамом, что, возможно, связано с меньшей полярностью ЦПГ. Так, коэффициент $K_{\text{мозг/плазма}}$ для ЦПГ на 35 % выше по сравнению с таковым для пирацетама, который немного больше 1 и устанавливается намного позже — через 2–3 ч после введения [11]. Однако полученные данные о преимуществах фармакокинетических параметров ЦПГ по сравнению с пирацетамом в полной мере не объясняют значительное различие используемых эффективных доз сравниваемых препаратов. Этот феномен, по всей вероятности, связан с более высоким аффинитетом ЦПГ по сравнению с пирацетамом к существующему, не идентифицированному в настоящее время, ноотропному рецептору и свидетельствует о том, что ЦПГ, являясь эндогенным соединением, имеет большее сродство к соответствующему рецептору, обнаруживаясь при этом в микромолярных концентрациях (10^{-6} – 10^{-9} М) [6]. Это заключение получило экспериментальное подтверждение при изучении антигипоксической и нейротропной активности ЦПГ.

При исследовании динамики развития антигипоксического действия ЦПГ было установлено, что

антигипоксический эффект ЦПГ выявляется уже через 5 мин после его введения в дозах 0,5–1,0 мг/кг, усиливается через 15 мин и сохраняется через 30 и 60 мин после введения ЦПГ. Таким образом, ЦПГ обладает быстро наступающим и продолжительным антигипоксическим эффектом, в чём наблюдалось сходство с пирацетамом [5]. Пирацетам также увеличивал продолжительность жизни опытных животных в условиях гипоксии, однако его антигипоксический эффект проявлялся при введении в более высоких дозах — 1 000 мг/кг и выше [11]. Результаты изучения антигипоксического эффекта ЦПГ представлены на рис. 3.

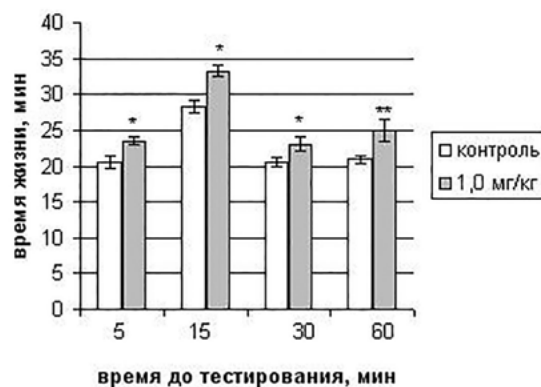


Рис. 3. Продолжительность антигипоксического действия ЦПГ (1 мг/кг) на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией в опытах на беспородных мышах с регистрацией эффекта через различные интервалы после введения вещества

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ относительно контроля по U-критерию Манна-Уитни.

При изучении нейропротективной активности ЦПГ на разных моделях ишемии головного мозга и в экспериментах на культуре ткани гиппокампа показано, что ЦПГ обладает нейропротективным действием, в чём также обнаруживается сходство с пирацетамом [5, 14, 15], однако этот эффект ЦПГ также, как и его антигипоксический эффект, на-

блюдается при большой разнице в дозах: для ЦПГ — 1 мг/кг, которая в экспериментах на культуре ткани мозга соответствует его концентрации — 10^{-6} – 10^{-9} М [14], в то время, как доза пираретама составляет 100–200 мг/кг, что соответствует 10^{-3} М [11].

Таким образом, при сравнительном изучении антигипоксического и нейропротективного действия ЦПГ и пираретама так же, как и при изучении других видов фармакологической активности (ноотропной, анксиолитической, антикаталептического действия) показано существенное различие в эффективных дозах ЦПГ и пираретама, что в полной мере нельзя объяснить различиями их фармакокинетических параметров, а возможно связано с их различным аффинитетом к рецепторам, принимающим участие в реализации фармакологических эффектов сравниваемых препаратов и, безусловно, связано с эндогенной природой ЦПГ. Продолжительность фармакологических эффектов ЦПГ, в частности, антигипоксической активности, можно объяснить длительным периодом полувыведения, продолжающимся в течение 1,5 ч после непосредственного введения ЦПГ и, по-видимому, метаболической устойчивостью ЦПГ, которая показана в работе Ковалева Г.И. [16]. Авторами показано также, что при введении крысам меченого ЦПГ, дипептид определяется в плазме через 60 мин в концентрации 4 нг/мл и продолжает обнаруживаться

через 90 мин после введения в концентрации 3,5 нг/мл плазмы [16].

Заключение

В результате проведенных исследований фармакокинетики пептидного аналога пираретама — ноопепта был открыт его активный метаболит циклической структуры ЦПГ, фармакокинетические параметры которого имеют значительные отличия по сравнению с аналогичными параметрами пираретама: более продолжительный период полувыведения в плазме и мозге крыс и более высокая биодоступность ЦПГ к ткани мозга по сравнению с пираретамом. На основе полученных нами данных о сходстве антигипоксического и нейропротективного действия ЦПГ и ранее опубликованных результатов о сходстве других фармакологических эффектов ЦПГ и пираретама можно сделать заключение, о том, что ЦПГ является миметиком пираретама. Тот факт, что ЦПГ проявляет фармакологическую активность в дозах, которые значительно меньше эффективных доз пираретама, нельзя в полной мере объяснить только различиями фармакокинетических параметров ЦПГ и пираретама. Возможно, он является результатом более высокого аффинитета ЦПГ, как эндогенного соединения к рецепторам, принимающим участие в механизме действия и реализации его фармакологических эффектов.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бойко Светлана Семёновна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: svboyko@gmail.com

ORCID ID: 0000-0003-2177-2010

SPIN-код: 4176-8921

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Boyko Svetlana

Corresponding author

e-mail: svboyko@gmail.com

ORCID ID: 0000-0003-2177-2010

SPIN-code: 4176-8921

Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Колясникова Ксения Николаевна

ORCID ID: 0000-0001-6797-692X

SPIN-код: 5682-2035

к. б. н., н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Boyko Svetlana

ORCID ID: 0000-0001-6797-692X

SPIN-code: 5682-2035

Candidate of Biological Sciences, Research scientist of laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Жердев Владимир Павлович

ORCID ID: 0000-0003-2710-7134

SPIN-код: 2213-9592

д. м. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Boyko Svetlana

ORCID ID: 0000-0003-2710-7134

SPIN-code: 2213-9592

MD, professor, Head of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Гудашева Т.А., Островская Р.У., Трофимов С.С., и др. Пептидные аналоги пирацетама как лиганды предполагаемых ноотропных рецепторов // *Химико-фармацевтический журнал*. — 1985. — Т. 19. — № 11. — С. 1322–1324. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Trofimov SS, et al. Peptides analogues of piracetam are ligands of nootropic receptors. *Kimiko-farmatsevticheskii Zhurnal*, 1985;19(11):1322–1324. (In Russ).]
2. Gudasheva TA, Boyko SS, Akparov VKh, et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. *FEBS Letters*. 1996;391(1-2):149–152. DOI:10.1016/0014-5793(96)00722-3
3. Гудашева Т.А., Островская Р.У., Трофимов С.С., и др. Новый эндогенный дипептид циклопролилглицин подобен пирацетаму по селективности мнемотропного эффекта // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 1999. — Т. 128. — № 10. — С. 411–413. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Trofimov SS, et al. New endogenous dipetide cycloprolyl-glicine is similar to piracetam by its mnemotrophic selectivity. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 1999;128(10):411–413. (In Russ).]
4. Гудашева Т.А., Константинопольский М.А., Островская Р.У., и др. Анксиолитическая активность эндогенного ноотропного пептида циклопролилглицина в тесте приподнятого крестообразного лабиринта // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2001. — Т. 131. — № 5. — С. 545–550. [Gudasheva TA, Konstantinopol'skii MA, Ostrovskaya RU, et al. Anxiolytic activity of endogenous nootropic dipeptide cycloprolylglycine in elevated plus-maze test. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2001;131(5):454–466. (In Russ).]
5. Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А., и др. Сходство цикло-пролилглицина с пирацетамом по антигипоксическому и нейрорепротекторному эффектам // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 2012. — Т. 75. — № 9. — С. 3–6. [Kolyasnikova KN, Gudasheva TA, Nazarova GA, et al. Similarity of cycloprolylglycine to piracetam in antihypoxic and neuroprotective effects. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2012;75(9):3–6. (In Russ).] DOI:10.30906/0869-2092-2012-75-9-3-6
6. Gudasheva TA, Boyko SS, Ostrovskaya RU, et al. The major metabolite of dipeptide piracetam analogue GVS-111 in rat brain and similarity to endogenous neuropeptide cycloprolylglycine. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1997;22(3):245–252. DOI:10.1007/BF03189814
7. Островская Р.У., Гудашева Т.А., Воронина Т.А. Оригинальный ноотропный и нейрорепротективный препарат ноопепт // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 2002. — Т. 65. — № 5. — С. 66–72. [Ostrovskaya RU, Gudasheva TA, Voronina TA, et al. The novel nootropic and neuroprotector drug noopept (GVS-111). *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2002;65(5):66–72. (In Russ).] DOI:10.30906/0869-2092-2002-65-5-66-72
8. Бойко С.С., Жердев В.П., Дворянинов А.А., и др. Фармакокинетика дипептидного аналога пирацетама с ноотропной активностью ГВС-111 и его основных метаболитов // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 1997. — Т. 60. — № 2. — С. 53–55. [Boiko SS, Zherdev VP, Dvoryaninov AA, et al. Pharmacokinetics of piracetam dipeptide analog with nootropic activity GVS-111 and its main metabolites. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 1997;60(2):53–55. (In Russ).]
9. Бойко С.С., Жердев В.П., Коротков С.А., и др. Фармакокинетика нового потенциально активного дипептидного препарата ГВС-111 и его метаболитов в мозге крыс // *Химико-фармацевтический журнал*. — 2001. — Т. 35. — № 9. — С. 11–13. [Boiko SS, Zherdev VP, Korotkov SA, et al. Pharmacokinetics of new potential dipeptide nootrope GVS-111 and its main metabolites in rat brain. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2001;35(9):11–13. (In Russ).]
10. Коротков С.А. Экспериментальное изучение фармакокинетики и биотрансформации нового дипептидного ноотропа ноопепта: Автореферат диссертации к. б. н. — М.: 2003. [Korotkov S.A. Eksperimental'noye izucheniye farmakokinetiki i biotransformatsii novogo dipeptidnogo nootropna noopepta. [dissertation] Moscow: 2003. (In Russ).] URL: <http://medical-diss.com/docreader/92464/a#?page=1>. (режим доступа 01.01.2019).
11. Nootropill. Ed. H. Van Hoof. 4-th rev.edition UCB, Brussels 1980. 224 p.
12. Prasad C. Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides*. 1995;16(1):151–164. DOI:10.1016/0196-9781(94)00017-z.
13. Бойко С.С., Гудашева Т.А., Вичужанин М.В., и др. Региональная и субклеточная локализация циклопролилглицина в мозге крыс // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2010. — Т. 149. — № 6. — С. 648–650. [Boiko SS, Gudasheva TA, Vichuzhanin MV, et al. Regional'naya i subkletoch'naya lokalizaciya cikloprolylglicina v mozge kryss. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2010;149(6):648–650. (In Russ).]
14. Николаев С.В., Логвинов И.О., Антипов П.И., и др. Нейропротекторное действие цикло-Л-пролилглицина на моделях повреждения нейрональных клеток *in vitro* // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. — 2017. — № 3. — С. 260–29. [Nikolaev SV, Logvinov IO, Antipov PI, et al. Neuroprotective effect of L-cycloprolylglycine on models neuronal cells damage *in vitro*. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2017;3:26–29. (In Russ).]
15. Поварнина П.Ю., Колясникова К.Н., Николаев С.В., и др. Нейропептид циклопролилглицин проявляет нейропротекторную активность при системном введении на модели неполной глобальной ишемии у крыс и в условиях глутаматной нейротоксичности *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2015. — Т. 160. — № 11. — С. 600–603. [Povarnina PYu, Kolyasnikova KN, Nikolaev SV, et al. Neuropeptide cycloprolylglycine exhibits neuroprotective activity after systemic administration to rats with modeled incomplete global ischemia and *in vitro* modeled glutamate neurotoxicity. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2015;160(11):600–603. (In Russ).]
16. Ковалев Г.И., Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., и др. Изучение фармакокинетики [3H]-циклопролилглицина в крови крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. — 2018. — № 3. — С. 48–54. [Kovalev GI, Zolotarev YuA, Dadayan AK, et al. The Study of cycloprolylglycine pharmacokinetics in rat blood. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;3:48–54. (In Russ).] DOI:10.24411/2588-0519-2018-10024

Биосимиляр двухфазного инсулина человека: результаты двойного слепого рандомизированного сравнительного перекрёстного клинического исследования фармакокинетики

Каронова Т. Л.¹, Майоров А. Ю.², Макаренко И. Е.³, Кокшарова Е. О.², Авдеева О. И.³,
Андреева А. Т.¹, Драй Р. В.³

¹ – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России

² – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России

³ – ГК «Герофарм»

Резюме. Обоснование. Распространённость сахарного диабета 2-го типа чрезвычайно высока, и число таких больных постоянно увеличивается. У 30–40 % больных только инсулинотерапия позволяет достичь компенсации заболевания. Терапия готовыми смесями рассматривается как альтернативный вариант при инициации и интенсификации инсулинотерапии. Ринсулин® микс 30/70 – отечественный биосимиляр (биоаналог) препарата Хумулин® М3, представляет собой комбинацию 30 % раствора инсулина человека и 70 % суспензии инсулина-изофана. В программу клинических исследований биосимиляров препаратов инсулина входят исследования фармакологии: фармакокинетики, фармакодинамики и исследование клинической безопасности. Цель. Оценка биосимилярности препаратов Ринсулин® микс 30/70 (биоаналог) и Хумулин® М3 (оригинальный) в условиях гиперинсулинемического эугликемического клэмпа на здоровых добровольцах. Материалы и методы. Исследование проведено на здоровых добровольцах мужского пола в возрасте от 18 до 50 лет. Дизайн исследования – двойное слепое рандомизированное перекрёстное исследование сравнительной фармакокинетики препаратов. Препараты вводили подкожно в переднюю брюшную стенку в дозе 0,4 МЕ/кг однократно. Длительность забора крови для определения фармакокинетических параметров составила 24 ч: концентрацию инсулина в крови определяли методом иммуноферментного анализа. На основании уровня гликемии корректировали скорость инфузии глюкозы, данные которой использованы для расчёта фармакодинамических параметров. Результаты и обсуждение. Отмечена сопоставимость основных фармакокинетических и фармакодинамических характеристик препаратов Ринсулин® микс 30/70 и Хумулин® М3 в условиях гиперинсулинемического эугликемического клэмпа на здоровых добровольцах. Доверительный интервал для логарифмически преобразованного отношения значений параметра $C_{ins,max}$ составил 87,31–105,26 %, а $AUC_{ins,0-12}$ – 85,23–110,90 %, что попадает в заданные нормативными документами границы 80–125 % для установления сопоставимости между препаратами. Это подтверждает высокое подобие воспроизведённого препарата Ринсулин® микс 30/70 оригинальному препарату. Особую клиническую значимость имеет синхронное начало действия препаратов, время наступления максимального эффекта и продолжительность действия. Нежелательных явлений в исследовании, ассоциированных с введением препаратов, не зафиксировано. Выводы. Препараты Ринсулин® микс 30/70 и Хумулин® М3 являются эквивалентными.

Ключевые слова: инсулин генно-инженерный человеческий двухфазный; биосимиляр; фармакокинетика; фармакодинамика; гиперинсулинемический эугликемический клэмпа

Для цитирования:

Каронова Т.Л., Майоров А.Ю., Макаренко И.Е., Кокшарова Е. О., Авдеева О.И., Андреева А.Т., Драй Р.В. Биосимиляр двухфазного инсулина человека: результаты двойного слепого рандомизированного сравнительного перекрёстного клинического исследования фармакокинетики // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2019. – № 3. – С. 39–46. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10054

Biosimilar of biphasic human insulin: results of a double-blind randomized comparative cross-sectional clinical study of pharmacokinetics

Karonova TL¹, Mayorov AY², Makarenko IE³, Koksharova EO², Avdeeva OI³, Andreeva AT¹, Dry RV³

¹ – FSBI National Medical Research Center named after V.A. Almazov Ministry of Health of Russia

² – Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Endocrinology, Ministry of Health of Russia

³ – GEROPHARM

Resume. Justification. The prevalence of type 2 diabetes is extremely high, and the number of such patients is constantly increasing. In 30–40% of patients, only insulin therapy can achieve compensation for the disease. Therapy with ready-made mixtures is considered as an alternative option in the initiation and intensification of insulin therapy. Rinsulin® mix 30/70 is a domestic biosimilar (bioanalogue) of Humulin® M3, a combination of a 30% solution of human insulin and a 70% suspension of insulin-isofan. The clinical research program for biosimilars of insulin preparations includes pharmacology studies: pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical safety research. Purpose. Evaluation of the biosimilarity of Rinsulin® mix 30/70 (bioanalogue) and Humulin® M3 (original) preparations in the conditions of hyperinsulinemic euglycemic clamp in healthy volunteers. Materials and methods. The study was conducted on healthy male volunteers aged 18 to 50 years. Study design is a double-blind, randomized, crossover study of the comparative pharmacokinetics of drugs. The drugs were injected subcutaneously into the anterior abdominal wall at a dose of 0.4 IU / kg once. The duration of blood sampling to determine the pharmacokinetic parameters was 24 hours: the concentration of insulin in the blood was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Based on the level of glycemia, the glucose infusion rate was adjusted, the data of which were used to calculate the pharmacodynamic parameters. Results and discussion. Comparability of the main pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of the Rinsulin® mix 30/70 and Humulin® M3 preparations in the conditions of hyperinsulinemic euglycemic clamp in healthy volunteers was noted. The confidence interval for the logarithmically transformed ratio of the values of the parameter $C_{ins,max}$ was 87.31–105.26%, and $AUC_{ins,0-12}$ – 85.23–110.90%, which falls within the limits set by regulatory documents 80–125% to establish comparability between drugs. This confirms the high similarity of the reproduced Rinsulin® Mix 30/70 to the original drug. Of particular clinical significance is the synchronous onset of drug action, the time of onset of the maximum effect and duration of action. Adverse events in the study associated with the introduction of drugs were not recorded. Conclusions. Rinsulin® mix 30/70 and Humulin® M3 are equivalent.

Keywords: insulin genetically engineered human biphasic; biosimilar; pharmacokinetics; pharmacodynamics; hyperinsulinemic euglycemic clamp

For citations:

Karonova TL, Mayorov AY, Makarenko IE, Koksharova EO, Avdeeva OI, Andreeva AT, Dry RV. Biosimilar of biphasic human insulin: results of a double-blind randomized comparative cross-sectional clinical study of pharmacokinetics. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;3:39–46. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10054

Введение

Сахарный диабет 2-го типа (СД 2 типа) является хроническим заболеванием, представляющим собой серьёзную медико-социальную проблему. Распространённость СД 2-го типа чрезвычайно высока, и число таких больных постоянно увеличивается. По данным экспертов ВОЗ, общее количество больных сахарным диабетом к 2025 г. превысит 380 млн человек. По данным регистра больных СД, в России в 2018 г. число больных с СД составило более 4,62 млн, из них 4,27 млн страдают СД 2-го типа [1].

СД занимает третье место среди причин смерти после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Известно, что при установлении диагноза СД более 50 % больных уже имеют микро- и макрососудистые осложнения СД, а стоимость амбулаторной медицинской помощи при наличии осложнений увеличивает стоимость лечения в 3–13 раз [2].

В исследованиях DCCT, UKPDS, Steno-2 убедительно доказано, что достижение целевых значений гликемии снижает риск развития микро- и макрососудистых осложнений. Согласно Алгоритмам специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом [3], рекомендациям ADA и EASD, целевой уровень гликированного гемоглобина не должен превышать 7 %.

У 30–40 % больных СД 2 типа только инсулинотерапия позволяет достичь компенсации заболевания [4]. Существуют различные подходы к старту и интенсификации инсулинотерапии. Согласно рекомендациям ADA/EASD [5], пациентам, не достигшим компенсации на терапии пероральными сахароснижающими препаратами, обычно назначают терапию базальным инсулином. Когда целевые показатели гликемического контроля не достигнуты или его не удаётся поддерживать при проводимом режиме терапии, добавляют прандиальный инсулин. Терапия готовыми смесями рассматривается как альтернативный вариант при инициации и интенсификации инсулинотерапии. Согласно российским рекомендациям [3], готовые смеси используются как на старте инсулинотерапии наравне с базальным инсулином, так и в качестве интенсификации вместе с прандиальным инсулином.

В 2002 г. компанией ГЕРОФАРМ был зарегистрирован генно-инженерный инсулин человека (ГИИЧ) с полным циклом производства на территории РФ, на основе которого с 2004 г. в Российской Федерации успешно применяются препараты Ринсулин® Р (короткого действия) и Ринсулин® НПХ (средней продолжительности действия) — биосимиляры препаратов Хумулин® Регуляр и Хумулин® НПХ. За время их применения не было выявлено случаев отмены или приостановки действия регистрационных удостоверений. В рамках рутинных мероприятий по фармаконадзору также не было выявлено различий между препаратами.

Препарат двухфазного действия Ринсулин® микс 30/70 проходит процедуру регистрации в качестве воспроизведённого (биосимилярного) препарату Хумулин® М3. Двухфазность профиля достигается за счёт комбинации 30 % короткодействующего препарата Ринсулин® Р и 70 % препарата Ринсулин® НПХ с продолжительностью действия до 24 ч.

Клинические исследования ГИИЧ, подтвердившие свою биосимилярность референтному препарату по физико-химическим свойствам и в фармакологических испытаниях *in vitro*, включают исследования фармакологии: фармакокинетику (ФК), фармакодинамику (ФД) и исследование клинической безопасности.

Клиническое изучение фармакологических свойств инсулина проводят с помощью гиперинсулинемического эугликемического клэмп (ГЭК) [6–8]. ГЭК признанный эталонный метод для изучения фармакодинамических свойств антидиабетических препаратов [9–11], так как способен с высокой степенью точности обнаружить различия биосимиляра и референтного препарата [6, 12]. Результаты по сравнительной фармакологии тестируемого препарата (ТП) и препарата сравнения (ПС) также позволяют оценить и их клиническую сопоставимость, так как скорость инфузии глюкозы (СИГ) непосредственно измеряет фармакологическое действие инсулина, заключающееся в утилизации экзогенно поступившей глюкозы [10]. Следовательно, подтверждение аналогичного влияния препаратов на СИГ будет обеспечивать аналогичное терапевтическое действие [6–8, 12]. Таким образом, проводить отдельные исследования эффективности при изучении биоподобия инсулинов не требуется, поскольку конечные точки, изучаемые в этих исследованиях (обычно это HbA_{1c}), считаются недостаточно чувствительными для выявления потенциальных клинически значимых различий между двумя инсулинами [6–8, 12].

Цель исследования. Подтверждение биосимилярности препаратов Ринсулин® микс 30/70, суспензия для подкожного введения, 100 МЕ/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и Хумулин® М3, суспензия для подкожного введения, 100 МЕ/мл («Лилли Франс», Франция) в условиях ГЭК на здоровых добровольцах.

Материалы и методы

Дизайн исследования — двойное слепое рандомизированное перекрестное исследование сравнительной фармакокинетики ТП Ринсулин® микс 30/70 (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и ПС Хумулин® М3 («Лилли Франс», Франция).

В соответствии с нормативными рекомендациями [6, 7], исследование было проведено на добровольцах мужского пола в возрасте от 18 до 50 лет (включительно) европеоидной расы, с индексом массы тела 18,5–27 кг/м² с верифицированным диагнозом «здоров», по данным стандартных клинических, лабораторных и

инструментальных методов обследования. Основными критериями не включения были: эпизоды гипогликемии в анамнезе, или наличие в семейном анамнезе случаев верифицированного диагноза сахарный диабет у ближайших родственников; уровень глюкозы в плазме натощак $> 6,1$ ммоль/л; уровень $HbA_{1c} > 6\%$; пероральный глюкозотолерантный тест — уровень глюкозы в крови $\geq 7,8$ ммоль/л (через 2 ч после нагрузки глюкозой).

Исследование было проведено на базе клинических центров ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Для участия в исследовании были привлечены здоровые добровольцы из базы данных добровольцев исследовательских центров.

Длительность исследования для каждого добровольца не превысила 45 дней. Общая продолжительность исследования составила 3 мес. (с 18.07.2017 по 24.10.2017 гг.).

Каждый доброволец в данном исследовании прошёл 5 визитов в исследовательский центр.

Визит 1 — скрининг. На данном визите был собран медицинский анамнез, проводили стандартные клинический и биохимический анализы крови, анализ мочи, физикальный осмотр, оценку индекса массы тела, измерение жизненно важных показателей (артериального давления, частоты сердечных сокращений, частоты дыхательных движений). На основании результатов врач-исследователь делал вывод о соответствии добровольца критериям для участия в исследовании.

Визит 2 и 4 — ГЭК. Добровольцев, успешно прошедших скрининг (сокращённый скрининг), приглашали в исследовательские центры для проведения периодов ГЭК. В периоде I ГЭК (Визит 2) добровольцев рандомизировали в одну из двух исследуемых групп, за исключением этого, период I ГЭК (Визит 2) и период II ГЭК (Визит 4) были аналогичны. Добровольцев накануне проведения ГЭК госпитализировали в клинический центр. Последний приём пищи был не позднее 19.00 с целью обеспечения проведения процедур исследования натощак с периодом голодания не менее 12 ч до инъекции исследуемого препарата (ИП).

За полтора часа перед началом процедуры ГЭК проводили обследование в рамках изучения безопасности ИП: физикальный осмотр и оценку жизненно важных показателей. Примерно за 60 мин до планируемого введения ИП участники принимали горизонтальное положение, производили подготовку к процедуре ГЭК с постановкой внутривенных катетеров и линий для инфузий в локтевую вену одной руки и вену кисти другой руки. Проводили мониторинг концентрации глюкозы в крови добровольцев (за 60 и 30 мин до введения ИП). Если уровень глюкозы в крови находился в целевом диапазоне (4,4–5,6 ммоль/л), то такого до-

бровольца подвергали процедуре ГЭК. Если уровень глюкозы в крови был за пределами этих границ, ГЭК для данного участника переносили на другой день.

Исследование было двойным слепым с целью снижения возможной необъективности исследователя. ИП поступали в клинический центр в одинаковых упаковках разослепленной команде, которая подготавливала ИП для введения субъекту исследования. Приготовление осуществляли за определённое время до инъекции в соответствии с предоставленными инструкциями. Инъекцию ИП производила заслепленная команда непосредственно перед ГЭК в дозе 0,4 МЕ/кг однократно подкожно в область подкожно-жировой клетчатки передней брюшной стенки живота.

После инъекции ИП контролировали уровень глюкозы в крови. Началом действия ИП считали снижение уровня глюкозы в крови на величину более 5 % от изначальной величины. При регистрации начала действия ИП начинали управляемую инфузию раствора глюкозы для поддержания целевого уровня глюкозы в крови 4,4–5,6 ммоль/л (80–100 мг/дл). Контроль и коррекцию СИГ производили каждые 5 мин в течение первых 10 ч, с 10 до 12 часов — каждые 10 мин, с 12 до 24 часов (или до окончания гипогликемического действия ИП) — каждые 15 мин.

Визит 3 — сокращённый скрининг. Визит проходил перед II периодом ГЭК (визитом 4), с целью подтверждения соответствия добровольца критериям для продолжения исследования. Проводили процедуры аналогичные визиту 1, кроме сбора демографических данных и медицинского анамнеза.

Визит 5 — заключительный визит безопасности. На данном визите проводили стандартные клинический и биохимический анализы крови, анализ мочи, физикальный осмотр, оценку индекса массы тела, измерение жизненно важных показателей (артериального давления, частоты сердечных сокращений, частоты дыхательных движений).

Первичными конечными точками в настоящем исследовании являлись фармакокинетические показатели ИП: суммарная площадь под кривой (AUC) «концентрация исследуемого инсулина — время» в интервале времени от 0 до 12 ч ($AUC_{ins,0-12}$), максимальная концентрация инсулина в крови за период наблюдения ($C_{ins,max}$).

Вторичными конечными точками в настоящем исследовании являлись фармакокинетические показатели ИП: $AUC_{ins,0-2}$; $AUC_{ins,0-6}$; $AUC_{ins,0-24}$; $AUC_{ins,0-\infty}$; время достижения максимальной концентрации инсулина — t_{max} ; период полувыведения инсулина — $t_{1/2}$; а также следующие фармакодинамические показатели: суммарная площадь под кривой «СИГ-время» в интервале времени от 0 до 12 ч ($AUC_{GIR0-12}$); до 24 ч — $AUC_{GIR0-24}$; максимальная СИГ за период исследования — GIR_{max} ; время достижения максимальной СИГ глюкозы — $tGIR_{max}$; время между введением ИП и началом инфузии глюкозы — $tGIR_{lag}$.

Критериями оценки безопасности в настоящем исследовании являлись: частота и тяжесть возникновения нежелательных явлений (НЯ); отклонения от нормы жизненно важных показателей: артериального давления, частоты сердечных сокращений, частоты дыхательных движений, температуры тел; частота возникновения местных реакций в месте инъекции; отклонения от нормы уровня калия в крови; отклонения от нормы лабораторных показателей и ЭКГ.

Анализ результатов проводили на данных, полученных непосредственно после введения ТП и ПС, группы Ринсулин® микс 30/70 и Хумулин® М3, соответственно.

Каждому добровольцу вводили ТП и ПС (в разные периоды ГЭК). Для создания рандомизационной последовательности использовали стандартные функции программного обеспечения R 3.4.2. Таким образом, обеспечивалось сбалансированное случайное распределение добровольцев по 2 исследуемым группам в соотношении 1:1. Информацию о рандомизационных номерах передавали в исследовательский центр в запечатанных конвертах. Первая группа получила во время первого периода ТП, а во время второго периода — ПС. Вторая группа, наоборот — во время первого периода получила ПС, а во время второго периода — ТП. Очередность периодов была неизвестна для добровольцев и исследователей.

Фармакокинетика. Для получения первичных данных по фармакокинетике отбор крови для определения концентрации инсулина в крови производили за 30 мин и непосредственно до введения ИП и после введения ИП по следующей схеме: до точки 5 ч отбор осуществляли каждые 15 мин, до точки 10 ч каждые 30 мин, до точки 16 ч каждые 60 мин, затем до конца исследования (точка 24 ч или момент прекращения инфузии раствора глюкозы) — каждые 120 мин. Общая продолжительность наблюдения составила 24 ч, однако в соответствии с принятыми стандартами [6–8] анализ данных осуществляли в пределах дозирочного интервала, который для ИП составил 12 ч.

Угнетение выработки собственного инсулина подтверждали с помощью определения концентрации С-пептида в точках 0, 30, 60, 90, 120 мин, 12, 18 и 24 ч (или в момент прекращения инфузии глюкозы).

Количественное определение инсулина и С-пептида было проведено в аналитической лаборатории ООО «Квинта-Аналитика Ярославль» методом иммуноферментного анализа (ИФА) по заранее валидированной методике. Транспортировка из исследовательского центра была выполнена с соблюдением холодовой цепи при -20°C . Анализ выполнен на автоматическом иммуноферментном анализаторе Personal Lab, производства Adaltis S.r.l., Италия.

Фармакодинамика. Количественное определение глюкозы в образцах цельной венозной крови в период ГЭК производили с помощью откалиброванных глюкометров StatStrip Glucose and β -Ketone Hospital Meter производства Nova Biomedical, США [13, 14].

Каждый доброволец подписал информированное согласие до начала любых процедур исследования. Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации, принципами Надлежащей клинической практики и локальными регуляторными требованиями. Протокол исследования был одобрен Министерством Здравоохранения РФ (разрешение № 302 от 29.04.2016), а также независимыми этическими комитетами при клинических центрах ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России, Москва (выписка из протокола № 12 от 28 июня 2017 г.) и ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург (выписка из протокола № 121 от 14 августа 2017 г.).

Принципы расчёта размера выборки. Расчёт размера выборки был определён целью исследования — сравнением фармакокинетических свойств препаратов Ринсулин® микс 30/70 и Хумулин® М3 у здоровых добровольцев. Для расчёта размера выборки были использованы данные по среднему значению и стандартному отклонению первичных фармакокинетических показателей $AUC_{ins.}$ и $C_{ins.max}$ [15]. Расчёт размера выборки был выполнен для более варибельного показателя, которым оказался $AUC_{ins.}$.

Методы статистического анализа данных. Статистическую обработку данных и оформление результатов проводили с помощью пакетов программного обеспечения R 3.4.2. Площадь под кривой рассчитывали методом трапеций.

Анализ первичных ФК параметров $C_{ins.max}$ и $AUC_{ins.0-12}$ проводили в предположении о лог-нормальном распределении показателей. После проведения логарифмического преобразования (по основанию натурального логарифма) эти показатели анализировали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием общей линейной модели. Модель дисперсионного анализа включала следующие факторы: последовательность введения препаратов, доброволец (включённый в последовательность), период исследования и препарат как источники вариации. Полученную оценку остаточной вариации использовали при расчёте 90 % доверительных интервалов для отношения геометрических средних ФК параметров $C_{ins.max}$ и $AUC_{ins.0-12}$ ТП (Ринсулин® микс 30/70) к ПС (Хумулин® М3). Сопоставимость считалась доказанной, если 90 % доверительные интервалы находились в пределах 80–125 % [7, 12].

Расчёт доверительных интервалов для фармакодинамических параметров не проводили, так как в соответствии с требованиями нормативных документов [6–8] сопоставление фармакодинамических профилей для инсулинов двухфазного действия при разработке препарата инсулина короткого/ультракороткого действия с тем же действующим веществом не требуется.

Сопоставление фармакодинамических профилей производится только для растворимой формы (инсулина короткого/ультракороткого действия).

Вторичные ФК параметры ($AUC_{ins,0-2}$, $AUC_{ins,0-6}$, $AUC_{ins,0-24}$, $AUC_{ins,0-\infty}$, $t_{1/2}$, t_{max}) и ФД параметры (GIR_{max} , $AUC_{GIR0-12}$, $AUC_{GIR0-24}$, $tGIR_{max}$, $tGIR_{lag}$) анализировали с помощью показателей описательной статистики.

Анализ данных о НЯ выполнен с использованием критерия Фишера.

Результаты и обсуждение

После прохождения скрининга в исследование было включено 32 здоровых добровольца, соответствующих критериям включения/невключения. Характеристика добровольцев представлена в табл. 1.

Таблица 1

Демографическая и антропометрическая информация обо всех рандомизированных субъектах (среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n = 32$)

Показатель	Значения
Возраст (лет)	29,41 $\pm$ 4,90
Масса тела (кг)	77,85 $\pm$ 9,81
Рост (см)	181,84 $\pm$ 5,42
ИМТ (кг/м ²)	23,49 $\pm$ 2,34

Динамика изменений уровней С-пептида, как маркера выработки собственного инсулина в ответ на внутривенное введение раствора глюкозы, была проанализирована для каждого участника. Отличий между препаратами не выявлено ($p < 0,05$).

У ряда субъектов были выявлены единичные значимые повышения уровня С-пептида относительно исходного уровня (0 мин до введения ИП). За значимое повышение было принято увеличение уровня на 0,6041 нг/мл (200 пмоль/л) [10]. В большинстве случаев (96,4 %) разница составила меньше 0,6041 нг/мл, что свидетельствовало об отсутствии выработки эндогенного инсулина в ответ на внутривенное введение раствора глюкозы, тем самым подтверждая удовлетворительное

качество проведения клэмп-исследования.

На основании результатов измерения уровня глюкозы в крови в течение клэмпа также были рассчитаны показатели, подтвердившие удовлетворительное качество клэмп-исследования:

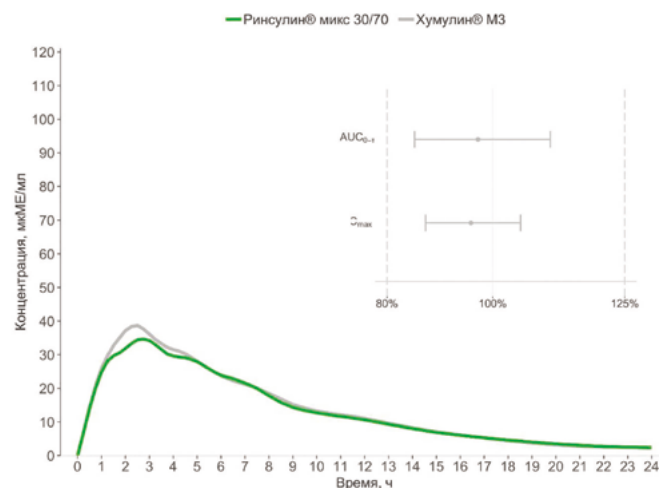


Рис. 1. Усреднённые фармакокинетические профили концентрации инсулина в плазме крови участников после подкожного введения ТП и ПС ($n = 32$)

- среднее значение коэффициента вариации (CV, %) составило $5,61 \pm 0,94$ % в группе ТП Ринсулин® микс 30/70 и $5,48 \pm 0,88$ % в группе ПС Хумулин® М3;
- значение разницы от целевого уровня 5 ммоль/л в течение клэмп-теста составило $0,23 \pm 0,04$ ммоль/л в группе ТП Ринсулин® микс 30/70 и $0,23 \pm 0,04$ ммоль/л в группе ПС Хумулин® М3.

На рис. 1 представлены усредненные фармакокинетические кривые «концентрация–время» ТП и ПС в плазме крови добровольцев. Отмечена сопоставимость основных фармакокинетических характеристик (табл. 2). Так, C_{max} составила $46,20 \pm 12,65$ и $48,25 \pm 13,85$ мкМЕ/мл, t_{max} – $3,41 \pm 1,46$ и $3,52 \pm 1,85$ ч, а AUC_{0-12} – $257,80 \pm 87,63$ и $271,03 \pm 106,39$ (мкМЕ/мл) $\times$ ч, соответственно.

Таблица 2

Фармакокинетические параметры исследуемых препаратов, результаты оценки эквивалентности ($n = 32$)

Параметры	Ринсулин® микс 30/70 (ТП) а	Хумулин® М3 (ПС) а	Отношение ТП/ПС [90 % ДИ] b
$C_{ins,max}$, мкМЕ/мл	46,20 $\pm$ 12,65	48,25 $\pm$ 13,85	0,96 [87,31; 105,26]
$AUC_{ins,0-12}$, (мкМЕ/мл) $\times$ ч	257,80 $\pm$ 87,63	271,03 $\pm$ 106,39	0,97 [85,23; 110,90]
$AUC_{ins,0-2}$, (мкМЕ/мл) $\times$ ч	41,87 $\pm$ 17,87	45,40 $\pm$ 23,49	
$AUC_{ins,0-6}$, (мкМЕ/мл) $\times$ ч	161,53 $\pm$ 57,50	172,38 $\pm$ 69,87	
$AUC_{ins,0-24}$, ((мкМЕ/мл) $\times$ ч	318,55 $\pm$ 112,89	330,77 $\pm$ 125,95	
$AUC_{0-\infty}$, (мкМЕ/мл) $\times$ ч	362,16 $\pm$ 127,74	412,91 $\pm$ 220,26	
t_{max} , ч	3,41 $\pm$ 1,46	3,52 $\pm$ 1,85	
$t_{1/2}$, ч	5,71 $\pm$ 4,45	8,14 $\pm$ 11,42	

Примечание: а – результаты представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение; b – представлено отношение геометрических средних, для отношения ФК параметров приведен 90 % ДИ.

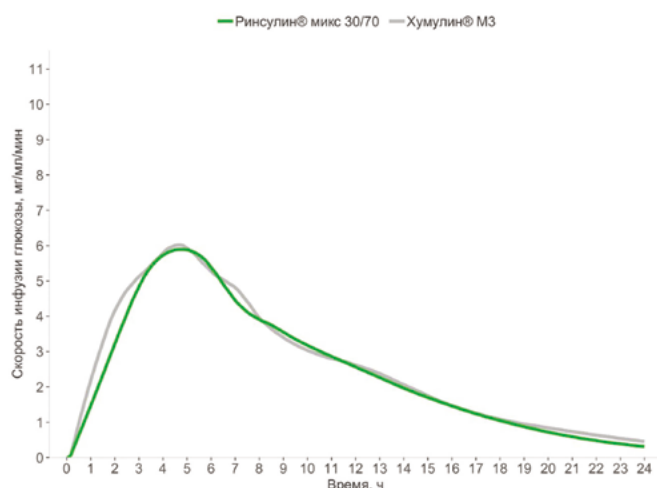


Рис. 2. Усредненные фармакодинамические кривые «СИГ–время» после подкожной инъекции ТП и ПС

На рис. 2 представлены усредненные ФД кривые «СИГ–время». Зафиксирована сопоставимость параметров действия ТП и ПС у добровольцев (табл. 3). Так, начало действия ИП ($tGIR_{lag}$) зафиксировано в $0,56 \pm 0,32$ и $0,58 \pm 0,35$ ч, соответственно. Также сопоставимыми были время достижения максимальной скорости инфузии глюкозы ($tGIR_{max}$), т. е. время наступления максимального эффекта изучаемых инсулинов и максимальная СИГ (GIR_{max}) – собственно максимальный эффект. $tGIR_{max}$ составил $4,85 \pm 1,14$ и $4,81 \pm 1,36$ ч, GIR_{max} – $7,16 \pm 2,17$ и $7,21 \pm 2,01$ мг/кг/мин соответственно, для ТП и ПС. Площади под кривыми $AUC_{GIR0-12}$ составили $45,84 \pm 15,22$ и $47,83 \pm 14,53$ (мг/кг) $\times$ 60, соответственно. Эти данные в совокупности с характерами кривых «СИГ–время» свидетельствуют о сопоставимости ФД эффектов ИП.

Количество выявленных нежелательных явлений приведено в табл. 4. Статистически значимых различий между сравниваемыми препаратами не выявлено. Степень тяжести всех НЯ была расценена врачом-исследователем как лёгкая. У 10 добровольцев (6 – в группе тестируемого препарата, 4 – в группе препарата сравнения) были зарегистрированы 13 НЯ.

В исследовании были зафиксированы следующие виды НЯ: «Флебит» (3 случая, из них 2 случая в

группе тестируемого препарата и 1 случай в группе препарата сравнения), «Тромбофлебит» (1 случай в группе препарата сравнения), «Железодефицитная анемия вторичная» (1 случай в группе тестируемого препарата), «Гипербилирубинемия» (3 случая в группе тестируемого препарата и 2 случая в группе препарата сравнения), «Повышение активности АЛТ» и «Повышение активности АСТ» (у одного и того же участника в группе тестируемого препарата), «Мочекаменная болезнь» (1 случай в группе тестируемого препарата). Все НЯ были оценены врачами-исследователями как имеющие возможную связь с введением препаратов, однако, учитывая особенности манипуляций в клэмп-исследовании, а также возможные транзиторные метаболические нарушения при гиперинсулинемии, данные НЯ представляются не связанными с введением препаратов, а были обусловлены манипуляциями в ходе проведения исследования. Все НЯ завершились полным выздоровлением. Медикаментозная терапия потребовалась только в случае флебита (гепариновая мазь) и тромбофлебита (гепариновая мазь + ацетилсалициловая кислота).

Все жизненно важные показатели и показатели, полученные с помощью лабораторных и инструментальных способов исследования, оставались в пределах нормы или вариантов нормы, или имели клинически незначимые отклонения (кроме случаев обозначенных НЯ). Уровень ионов калия в крови оставался стабильным в течение исследования. Местных реакций на введение ИП не обнаружено.

В соответствии с регуляторными требованиями [6–8, 12] статистическая оценка эквивалентности ИП была проведена на основании укладывания 90 % доверительного интервала отношения первичных ФК-конечных точек ТП к ПС в заранее определённые границы эквивалентности. Границами эквивалентности служили рекомендованные Европейскими и отечественными требованиями к изучению биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный инсулин и аналоги инсулина, 80–125 %. В данном исследовании было выявлено, что доверительный интервал для логарифмически преобразованного отношения значений параметра $C_{ins,max}$ составил 87,31–105,26 %, а $AUC_{ins,0-12}$ – 85,23–110,90 %.

Таблица 4

Нежелательные явления

	Ринсулин® микс 30/70 (n = 32)		Хумулин® М3 (n = 32)		p-value
	Число субъектов (%)	Количество случаев	Число субъектов (%)	Количество случаев	
Нежелательные явления	6 (18,75)	Лёгкая	4 (12,50)	Лёгкая	0,7323 ^f
		Средняя		Средняя	
		Тяжёлая		Тяжёлая	
		Всего		Всего	

Примечание: f – точный критерий Фишера.

Это подтвердило высокое подобие ТП Ринсулин® микс 30/70 оригинальному препарату.

Проанализированные фармакодинамические параметры сравниваемых препаратов были сопоставимы. Особую клиническую значимость имеет синхронное начало действия препаратов, время наступления максимального эффекта и продолжительность действия.

Качество проведенного клэмп-исследования, определенное по степени подавления секреции собственного инсулина и уровню удержания нормогликемии в течении клэмп-исследования, было удовлетворительным и сопоставимым между группами.

Ограничения исследования. Использование популяции здоровых волонтеров позволило минимизировать влияние факторов сопутствующих заболеваний на показатели концентрации инсулина и глюкозы в плазме крови. Тем не менее, полученные данные на однородной выборке без сопутствующих факторов искажения можно экстраполировать на всю популяцию пациентов с сахарным диабетом.

Выводы

На основании проведенного двойного слепого, рандомизированного, сравнительного, перекрёстного исследования фармакокинетики препаратов Ринсулин® микс 30/70, суспензия для подкожного введения, 100 МЕ/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и Хумулин® М3, суспензия для подкожного введения, 100 МЕ/мл («Лилли Франс», Франция) с использованием метода

гиперинсулинемического эугликемического клэмп на здоровых добровольцах ТП Ринсулин® микс 30/70 и ПС Хумулин® М3 являются эквивалентными. Сопоставимость также подтверждена на основе полученных данных ФД.

Сходность фармакологических (ФК/ФД) характеристик данных типов инсулинов позволяет экстраполировать эффективность референтного препарата Хумулин® М3, суспензия для подкожного введения, 100 МЕ/мл («Лилли Франс», Франция) на ТП Ринсулин® микс 30/70, суспензия для подкожного введения, 100 МЕ/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия).

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях. Все авторы принимали участие в разработке концепции, дизайна исследования и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

Каронова Т.Л., Майоров А.Ю., Кокшарова Е.О., Андреева А.Т. являются представителями клинических центров, проводивших описываемое клиническое исследование при финансовой поддержке ГЕРОФАРМ. Макаренко И.Е., Авдеева О.И., Драй Р.В. являются сотрудниками ГЕРОФАРМ.

Выражение признательности.

Авторы выражают признательность сотрудникам аналитической лаборатории ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», руководителю проекта Афонькиной Олене Валерьевне, руководителю отдела клинических операций Беликовой Татьяне Михайловне, а также редакции журнала «Фармакокинетика и фармакодинамика».

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Каронова Татьяна Леонидовна

ORCID ID: 0000-0002-1547-0123

SPIN-код: 3337-4071

д. м. н., гл. н. с., руководитель научно-исследовательской лабораторией клинической эндокринологии, эндокринолог, профессор кафедры внутренних болезней. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России

Майоров Александр Юрьевич

ORCID ID: 0000-0001-5825-3287

SPIN-код: 4275-7779

д. м. н., профессор, зав. отделом прогнозирования и инноваций диабета Института диабета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России

Макаренко Игорь Евгеньевич

ORCID ID: 0000-0003-2308-0608

SPIN-код: 8213-1789

к. м. н., руководитель отдела фармакологии и ранних фаз клинических исследований ГЕРОФАРМ

Karonova Tatyana

ORCID ID: 0000-0002-1547-0123

SPIN-code: 3337-4071

Doctor of Medical Science, Ph.D., head of the research laboratory of clinical endocrinology, endocrinologist, professor of the department of internal diseases. FSBI National Medical Research Center named after V.A. Almazova Ministry of Health of Russia

Mayorov Alexander

ORCID ID: 0000-0001-5825-3287

SPIN-code: 4275-7779

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head. Diabetes Forecasting and Innovation Division, Institute of Diabetes, Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Endocrinology, Ministry of Health of Russia

Makarenko Igor

ORCID ID: 0000-0003-3188-6257

SPIN-code: 8213-1789

MD, PhD, head of the department of pharmacology and early phases of clinical trials of GEROPHARM

Кокшарова Екатерина Олеговна

ORCID ID: 0000-0001-9896-4681

SPIN-код: 335-3438

н. с. лаборатории клэмп-технологий
Института диабета ФГБУ «Национальный
медицинский исследовательский центр
эндокринологии» Минздрава России

Koksharova Ekaterina

ORCID ID: 0000-0001-9896-4681

SPIN-code: 335-3438

Researcher, Laboratory of Clamp Technologies,
Institute of Diabetes, National Medical Research
Center for Endocrinology, Ministry of Health of
Russia

Авдеева Ольга Ильинична

Автор, ответственный за переписку

e-mail: olga.avdeeva@geropharm.com

ORCID ID: 0000-0002-6759-4283

SPIN-код: 2395-3691

к. фарм. н, медицинский писатель департа-
мента клинических исследований ГЕРОФАРМ

Avdeeva Olga Ilyinichna

Corresponding author

e-mail: olga.avdeeva@geropharm.com

ORCID ID: 0000-0002-6759-4283

SPIN-code: 2395-3691

PhD in Pharmaceutical Science, medical writer,
Department of Clinical Research, GEROPHARM

Андреева Алена Тимуровна

м. н. с. научно-исследовательской лаборатории
клинической эндокринологии, эндокринолог.
ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр имени В.А.
Алмазова» Минздрава России

Andreeva Alena

junior researcher at the research laboratory of
clinical endocrinology, endocrinologist. FSBI Na-
tional Medical Research Center named after V.A.
Almazova Ministry of Health of Russia

Драй Роман Васильевич

ORCID ID: 0000-0003-4594-6097

SPIN-код: 5271-0404

к. м. н., директор R&D ГЕРОФАРМ

Dray Roman

ORCID ID: 0000-0003-4594-6097

SPIN-code: 5271-0404

MD, PhD, director of R&D GEROPHARM

Литература / References

1. Федеральный регистр больных сахарным диабетом. [Federal'nyj registr bol'nyh saharnym diabetom [Internet] (In Russ).] URL: <http://diaregistry.ru>. (data обращения 03.2019).
2. Результаты реализации подпрограммы «Сахарный диабет» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями 2007–2012 годы» / Под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой // *Сахарный диабет*. 2013. Спецвыпуск. [Rezultaty realizacii podprogrammy «Saharnyj diabet» Federal'noj celevoj programmy «Preduprezhdenie i bor'ba s social'no znachimymi zabolevaniyami 2007–2012 gody» / Ed by I.I. Dedova, M.V. Shestakovo. *Diabetes mellitus*. 2013. Specvyпуск. (In Russ).]
3. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова. — 8-й выпуск. — М.: УП ПРИНТ; 2017. [Standards of Specialized Diabetes Care / Ed. by Dedov II, Shestakova MV, Mayorov AY. 8th Edition. Moscow: UP PRINT; 2017. (In Russ).] DOI: 10.14341/DM20171S8
4. Джавахишвили Т.Ш., Романцова Т.И., Роик О.В. Динамика массы тела у больных сахарным диабетом 2 типа в течение первого года инсулинотерапии // *Ожирение и метаболизм*. — 2010. — № 4. — С. 13–19. [Dzhavahishvili TSH, Romancova TI, Roik OV. Dinamika massy tela u bol'nyh saharnym diabetom 2 tipa v techenie pervogo goda insulinoterapii. *Ozhirenie i metabolizm*. 2010;4:13–19. (In Russ).]
5. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. *Diabetes Care*. 2009 Jan;32(1):193–203. DOI: 10.2337/dc08-9025
6. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues (EMA/CHMP/BMWP/32775/2005 Rev. 1).
7. Решение № 89 от 3 ноября 2016 года "Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза", глава 15.7 "Доклиническая и клиническая разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарствен-

ных препаратов, содержащих рекомбинантный инсулин и аналоги инсулина". [Decision № 89 of Nov 3 2016 "Ob utverzhdenii pravil provedeniya issledovaniy biologicheskikh lekarstvennykh sredstv Evraziyskogo ekonomicheskogo soyuza", glava 15.7 "Doklinicheskaya i klinicheskaya razrabotka bioanalogichnykh (biopodobnykh) lekarstvennykh preparatov, soderzhashchih rekombinantnyj insulin i analogi insulina". (In Russ).]

8. Разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции генно-инженерный инсулин человека или аналоги инсулина человека // Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том IV. — М.: Полиграфплюс; 2014. [Razrabotka bioanalogichnykh (biopodobnykh) lekarstvennykh preparatov, soderzhashchikh v kachestve farmatsevticheskoy substantzii genno-inzhenernyy insulin cheloveka ili analogi insulina cheloveka. In: Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv. Vol. IV. Moscow: Poligraf-plyus; 2014. (In Russ).]

9. Heinemann L, Anderson JH. Measurement of insulin absorption and insulin action. *Diabetes Technol Ther*. 2004 Oct;6(5):698–718. DOI: 10.1089/dia.2004.6.698

10. Heise T, Zijlstra E, Nosek L, et al. Euglycaemic glucose clamp: what it can and cannot do, and how to do it. *Diabetes Obes Metab*. 2016 Oct;18(10):962–72. DOI: 10.1111/dom.12703

11. Hompesch M, Rave K. An Analysis of How to Measure Glucose during Glucose Clamps: Are Glucose Meters Ready for Research? *J. Diabetes Sci. Technol*. 2008; 2(5):896–898. DOI: 10.1177/193229680800200522

12. Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04 Rev. 1).

13. Rabiee A, Magruder JT, Grant C, et al. Accuracy and reliability of the Nova StatStrip® glucose meter for real-time blood glucose determinations during glucose clamp studies. *J Diabetes Sci Technol*. 2010 Sep 1;4(5):1195–201. DOI: 10.1177/193229681000400519

14. Lindquist KA, Chow K, West A, et al. The StatStrip glucose monitor is suitable for use during hyperinsulinemic euglycemic clamps in a pediatric population. *Diabetes technology & therapeutics*. 2014;16(5):298–302.

15. Woodworth JR, Howey DC, Bowsher RR, et al. Comparative pharmacokinetics and glucodynamics of two human insulin mixtures. 70/30 and 50/50 insulin mixtures. *Diabetes Care*. 1994;17(5):366–371.

Результаты двойного слепого рандомизированного сравнительного перекрёстного исследования фармакокинетики и фармакодинамики препаратов генно-инженерного инсулина человека

Майоров А. Ю.¹, Авдеева О. И.², Кокшарова Е. О.¹, Беликова Т. М.²,
Мишина Е. Е.¹, Драй Р. В.²

¹ – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России, Москва

² – ГК «Герофарм», Санкт-Петербург

Резюме. Обоснование. В среднем, из всех мировых расходов на здравоохранение на сахарный диабет приходится около 12 %. Одним из первых отечественных препаратов инсулина человека стал Ринсулин® Р, биосимиляр (биоаналог) препарата Хумулин® Регуляр. В программу клинических исследований биосимиляров препаратов инсулина входят исследования фармакологии: фармакокинетики, фармакодинамики и исследование клинической безопасности. Цель. Оценка биосимилярности препаратов Ринсулин® Р (биосимиляр) и Хумулин® Регуляр (оригинальный) в условиях гиперинсулинемического эугликемического клэмп на здоровых добровольцах. Материалы и методы. Исследование проведено на здоровых добровольцах мужского пола в возрасте от 18 до 50 лет. Дизайн исследования – двойное слепое рандомизированное перекрёстное исследование сравнительной фармакокинетики и фармакодинамики препаратов. Препараты вводили подкожно в переднюю брюшную стенку в дозе 0,3 МЕ/кг однократно. Длительность забора крови для определения фармакокинетических параметров составила 10 ч: концентрацию инсулина в крови определяли методом иммуноферментного анализа. На основании уровня гликемии корректировали скорость инфузии глюкозы, данные которой использованы для расчёта фармакодинамических параметров. Результаты и обсуждение. Установлено, что исследуемые препараты характеризуются высокой степенью сходства показателей фармакокинетики и фармакодинамики. 90 % доверительные интервалы для отношений средних геометрических значений первичных показателей фармакокинетики $AUC_{ins,0-t}$ и $C_{ins,max}$ полностью соответствуют допустимым пределам 80–125 % и составляют, соответственно, 88,61–111,52 и 85,41–109,51 %. 95 % доверительные интервалы для отношений средних геометрических значений первичных показателей фармакодинамики $AUC_{GIR,0-t}$ и GIR_{max} полностью соответствуют допустимым пределам 80–125 % и составляют, соответственно, 93,48–112,29 и 95,75–109,17 %. Особую клиническую значимость имеют синхронное начало действия препаратов, время наступления максимального эффекта и продолжительность действия. Частота нежелательных явлений была сопоставима в группах препаратов. Выводы. Препараты Ринсулин® Р и Хумулин® Регуляр являются эквивалентными.

Ключевые слова: инсулин генно-инженерный человеческий; биосимиляр; фармакокинетика; фармакодинамика; гиперинсулинемический эугликемический клэмп

Для цитирования:

Майоров А.Ю., Авдеева О.И., Кокшарова Е.О., Беликова Т.М., Мишина Е.Е., Драй Р.В. Результаты двойного слепого рандомизированного сравнительного перекрёстного исследования фармакокинетики и фармакодинамики препаратов генно-инженерного инсулина человека // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 3. – С. 47–55. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10055

Results of a double-blind, randomized, comparative, cross-sectional study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of genetically engineered human insulin preparations

Mayorov AY¹, Avdeeva OI², Koksharova EO¹, Belikova TM², Mishina EE¹, Dry RB²

¹ – FSBI «National Medical Research Center for Endocrinology, Ministry of Health of Russia», Moscow

² – GEROPHARM, Sankt-Peterburg

Resume. Justification. On average, about 12 % of all global healthcare spending on diabetes. One of the first domestic human insulin preparations was Rinsulin® R, the biosimilar (bioanalog) of Humulin® Regular. The clinical research program for biosimilars of insulin preparations includes pharmacology studies: pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical safety research. **Purpose.** Evaluation of the biosimilarity of the Rinsulin® R (biosimilar) and Humulin® Regular (original) preparations in the conditions of hyperinsulinemic euglycemic clamp in healthy volunteers. Materials and methods. The study was conducted on healthy male volunteers aged 18 to 50 years. Study design is a double-blind, randomized, cross-sectional study of comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. The drugs were injected subcutaneously into the anterior abdominal wall at a dose of 0.3 IU / kg once. The duration of blood sampling to determine the pharmacokinetic parameters was 10 hours: the concentration of insulin in the blood was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Based on the level of glycemia, the glucose infusion rate was adjusted, the data of which were used to calculate the pharmacodynamic parameters. **Results and discussion.** It was found that the studied drugs are characterized by a high degree of similarity of pharmacokinetics and pharmacodynamics. 90 % confidence intervals for the ratios of the geometric mean values of the primary pharmacokinetics $AUC_{ins,0-t}$ and $C_{ins,max}$ fully correspond to the permissible limits of 80–125 % and are, respectively, 88.61–111.52 and 85.41–109.51 %. 95 % confidence intervals for the ratios of the geometric mean values of the primary pharmacodynamics $AUC_{GIR,0-t}$ and GIR_{max} fully correspond to the permissible limits of 80–125 % and are, respectively, 93.48–112.29 and 95.75–109.17 %. Of particular clinical significance are the synchronous onset of action of drugs, the time of onset of the maximum effect and duration of action. The frequency of adverse events was comparable in the drug groups. **Conclusions.** Rinsulin® R and Humulin® Regular are equivalent.

Keywords: genetic engineering human insulin; biosimilar; pharmacokinetics; pharmacodynamics; hyperinsulinemic euglycemic clamp

For citations:

Mayorov AY, Avdeeva OI, Koksharova EO, Belikova TM, Mishina EE, Dry RB. Results of a double-blind, randomized, comparative, cross-sectional study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of genetically engineered human insulin preparations. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;3:47–55. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10055

Введение

Сахарный диабет (СД) представляет собой серьёзнейшую медицинскую и социально-экономическую проблему во всем мире. По данным Международной Диабетической Федерации, в настоящий момент в мире около 425 млн человек страдают СД. К 2045 г. прогнозируется рост числа больных СД до 629 млн [1]. По данным Российского Федерального регистра, больных сахарным диабетом на 1 января 2019 г. зарегистрировано 4,62 млн человек с СД, за начало 2019 г. зафиксировано ещё 78,8 тыс. человек [2]. СД связан с колоссальными экономическими потерями практически во всех странах мира. Согласно исследованиям, в 2010 г. СД нанёс прямой ущерб мировой экономике в размере 376 млрд долларов США. Предполагается, что эта цифра увеличится к 2030 г. до 490 млрд. Косвенные экономические потери также весьма велики. В среднем, из всех мировых расходов на здравоохранение на СД приходится около 12 %. Экономические потери, связанные с СД, составляют в России около 3,12 млрд долларов США в год. К 2030 г. эта сумма может увеличиться до 3,35 млрд [3].

Главным направлением лечения больных с инсулинозависимым СД является заместительная инсулинотерапия, поскольку инсулин является наиболее действенным гипогликемическим агентом, применяемым в настоящее время в клинической практике. За время своего существования препараты инсулина прошли эволюцию от природного инсулина, получаемого из поджелудочной железы сельскохозяйственных животных, до рекомбинантных препаратов и аналогов человеческого инсулина, не отличающихся по степени проявления нежелательных явлений от эндогенного инсулина.

Отечественное фармацевтическое производство позволяет увеличить надёжность обеспечения больных препаратами, конкуренцию производителей и, в итоге, повысить доступность препаратов инсулина для людей, страдающих СД.

Препарат Ринсулин® Р, производства ООО «ГЕРОФАРМ» успешно применяется в Российской Федерации с 2004 г. как воспроизведенный (биосимилярный) препарата Хумулин® Регуляр [4]. За время применения не было выявлено случаев отмены или приостановки действия регистрационного удостоверения. В рамках рутинных мероприятий по фармаконадзору также не было выявлено различий между препаратами.

Однако, в связи с изменением нормативных требований [5–12] к программе доказательства биосимилярности препаратов инсулина, были проведены дополнительные сравнительные исследования, в том числе исследование клинической фармакологии. Золотым стандартом исследования клинической фармакологии инсулинов является метод гиперинсулинемического эугликемического клэмп (ГЭК), рекомендуемый

действующими нормативными стандартами [5, 11, 12]. Использование данного метода позволяет оценить как фармакокинетические (ФК), так и фармакодинамические (ФД) профили инсулинов и сделать вывод о подобии (биосимилярности) сравниваемых препаратов или выявить различия.

Благодаря этому, ГЭК отводят основную роль в программе доказательства биосимилярности [5, 6] как наиболее чувствительному методу сравнения ФК/ФД профилей [13, 14]. При этом полученные данные о сравнительной фармакологии тестируемого препарата (ТП) и препарата сравнения (ПС) могут служить подтверждением и их терапевтической эквивалентности, так как ФД показатель скорость инфузии глюкозы (СИГ) является принятым суррогатным маркером, который прямо измеряет эффект инсулина, заключающийся в утилизации экзогенно вводимой глюкозы [14]. Таким образом, проводить отдельные исследования эффективности при изучении биосимилярности инсулинов не требуется, поскольку конечные точки, изучаемые в этих исследованиях (обычно это HbA_{1c}), считаются недостаточно чувствительными для выявления потенциальных клинически значимых различий между двумя инсулинами [5, 6, 11, 12].

Цель исследования. Доказательство биосимилярности препаратов Ринсулин® Р, раствор для инъекций, 100 МЕ/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и Хумулин® Регуляр, раствор для инъекций, 100 МЕ/мл («Лилли Франс», Франция) в условиях ГЭК на здоровых добровольцах.

Материалы и методы

В качестве дизайна исследования было выбрано двойное слепое рандомизированное перекрёстное исследование сравнительной ФК и ФД ТП Ринсулин® Р (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и ПС Хумулин® Регуляр («Лилли Франс», Франция).

В соответствии с нормативными рекомендациями [5, 11], исследование было проведено на добровольцах мужского пола в возрасте от 18 до 50 лет (включительно) европеоидной расы, с индексом массы тела 18,5–27 кг/м² с верифицированным диагнозом «здоров» по данным стандартных клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования. Основными критериями не включения были: эпизоды гипогликемии в анамнезе или наличие в семейном анамнезе случаев верифицированного диагноза СД у ближайших родственников; уровень глюкозы в плазме натощак $\geq 6,1$ ммоль/л; уровень HbA_{1c} $>6\%$; пероральный глюкозотолерантный тест — уровень глюкозы в крови $\geq 7,8$ ммоль/л (через 2 ч после нагрузки глюкозой).

Исследование было проведено на базе клинического центра ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Для участия в исследовании были привлечены здоровые

добровольцы из базы данных добровольцев исследовательского центра.

Длительность исследования для каждого добровольца не превысила 43 дней. Общая продолжительность исследования составила 2,5 мес. (с 19.02.2018 по 04.05.2018 гг.).

Каждый доброволец в данном исследовании прошёл 5 визитов в исследовательский центр.

Визит 1 — скрининг. На данном визите был собран медицинский анамнез, проводили стандартные клинический и биохимический анализы крови, анализ мочи, физикальный осмотр, оценку индекса массы тела, измерение жизненно важных показателей (артериального давления, частоты сердечных сокращений, частоты дыхательных движений, температуры тела). На основании результатов врач-исследователь делал вывод о соответствии добровольца критериям для участия в исследовании.

Визит 2 и 4 — ГЭК. Добровольцев, успешно прошедших скрининг (сокращённый скрининг, см. визит 3), допускали к проведению исследовательских периодов ГЭК. В периоде I ГЭК (Визит 2) проводили рандомизацию добровольцев в одну из двух исследуемых групп; за исключением этого, период I ГЭК (Визит 2) и период II ГЭК (Визит 4) проходили аналогично. Добровольцев накануне проведения ГЭК госпитализировали в клинический центр. Последний приём пищи был не позднее 19.00 с целью обеспечения проведения процедур исследования натощак с периодом голодания не менее 12 ч до инъекции исследуемого препарата (ИП).

Утром перед началом проведения процедур ГЭК проводили обследование в рамках изучения безопасности ИП согласно протоколу (физикальный осмотр, оценка жизненно важных показателей). Также проводили забор крови на ФК и определения базального уровня глюкозы в крови.

Примерно за 60 мин до планируемого введения ИП участники принимали горизонтальное положение, производили подготовку к процедуре ГЭК с постановкой внутривенных катетеров и линий для инфузий в локтевую вену одной руки и вену кисти другой руки. Проводили мониторинг концентрации глюкозы в крови добровольцев. При соответствии уровня глюкозы в крови целевому диапазону (4,4–5,6 ммоль/л) в течение 2 часов до инъекции ИП такого добровольца подвергали процедуре ГЭК. Если уровень глюкозы в крови находился за пределами этих границ, исследователь мог перенести ГЭК для данного участника на другой день.

С целью снижения возможной необъективности исследователя ИП поступал в клинический центр в одинаковых упаковках разослепленной команде, основной обязанностью которых, помимо прочего, была подготовка ИП перед введением субъекту исследования. Приготовление осуществляли за определённое время до инъекции в соответствии с предоставленными инструкциями. После этого ИП в инсулиновом шприце передавали заслепленной команде для осуществления инъекции. ИП вводили непосредственно перед ГЭК в

дозе 0,3 МЕ/кг [5, 11, 12] однократно подкожно в область подкожно-жировой клетчатки передней брюшной стенки.

После инъекции ИП начинали контролировать уровень глюкозы в крови. За начало действия ИП принимали снижение уровня глюкозы в крови на величину более 5 % от изначальной величины. После начала действия ИП начинали управляемую инфузию раствора глюкозы для поддержания целевого уровня глюкозы в крови 4,4–5,6 ммоль/л (80–100 мг/дл). Контроль и коррекцию скорости инфузии глюкозы (СИГ) производили каждые 5 мин в течение первых 8 часов, далее до 10 часов — каждые 10 мин.

Визит 3 — сокращённый скрининг. Визит проходил перед II периодом ГЭК (визитом 4), с целью подтверждения соответствия добровольца критериям для продолжения исследования. Проводили процедуры аналогичные визиту 1, кроме сбора медицинского анамнеза и подписания информированного согласия.

Визит 5 — заключительный визит безопасности. На данном визите проводили стандартные клинический и биохимический анализы крови, анализ мочи, физикальный осмотр, оценку индекса массы тела, измерение жизненно важных показателей (артериального давления, частоты сердечных сокращений, частоты дыхательных движений).

Первичными конечными точками в настоящем исследовании являлись ФК показатели ИП: суммарная площадь под кривой (AUC) «концентрация исследуемого инсулина — время» в интервале времени от 0 до момента t отбора последней пробы биоматериала с определяемой концентрации активного вещества ($AUC_{ins,0-t}$), максимальная концентрация инсулина в крови за период наблюдения ($C_{ins,max}$), и ФД показатели ИП: суммарная площадь под кривой (AUC) «СИГ—время» в интервале времени от 0 до момента t отбора последней пробы биоматериала (AUC_{GIR0-t}), максимальная СИГ за период исследования (GIR_{max}).

Вторичными конечными точками в настоящем исследовании являлись ФК показатели ИП: $AUC_{ins,0-2}$; $AUC_{ins,0-4}$; $AUC_{ins,0-6}$; время достижения максимальной концентрации инсулина — t_{max} ; период полувыведения инсулина — $t_{1/2}$; а также следующие ФД показатели: AUC_{GIR0-2} ; AUC_{GIR0-4} ; AUC_{GIR0-6} ; время достижения максимальной СИГ — $tGIR_{max}$; время между введением ИП и началом инфузии глюкозы — $tGIR_{lag}$.

Критериями оценки безопасности в настоящем исследовании являлись: частота и тяжесть возникновения нежелательных явлений (НЯ); отклонения от нормы жизненно важных показателей: артериального давления, частоты сердечных сокращений, частоты дыхательных движений, температуры тела; частота возникновения местных реакций в месте инъекции; отклонение от нормы уровня калия в крови; отклонения от нормы лабораторных показателей и ЭКГ.

Анализ результатов проводили на данных, полученных непосредственно после введения ТП и ПС, группы Ринсулин® Р и Хумулин® Регуляр, соответственно.

Каждому добровольцу вводили ТП и ПС (в разные периоды ГЭК). С целью исключения предвзятости и иных факторов, влияющих на получаемые данные, а также формирования однородных групп, добровольцы после прохождения скрининга были рандомизированы в соотношении 1:1. Для создания рандомизационной последовательности использованы стандартные функции программного обеспечения R 3.4.2. Информацию о рандомизационных номерах передавали в исследовательский центр в запечатанных конвертах. Первая группа получила во время первого периода ТП, а во время второго периода — ПС. Вторая группа наоборот — во время первого периода получила ПС, а во время второго периода — ТП. Очередность периодов была неизвестна для добровольцев и исследователей.

Фармакокинетика. Для получения первичных данных по ФК отбор крови для определения концентрации инсулина в крови производили за –60 и –30 мин, непосредственно до введения ИП и после введения ИП по следующей схеме: первые 3 часа отбор осуществляли каждые 15 мин, затем до конца исследования — каждые 30 мин. Общая продолжительность наблюдения составила 10 ч.

Для подтверждения угнетения выработки собственного инсулина осуществляли отбор образцов плазмы для определения концентрации С-пептида в точках отбора крови для определения концентрации инсулина.

Количественное определение инсулина и С-пептида было проведено в аналитической лаборатории ООО «Квинта-Аналитика Ярославль» методом иммуноферментного анализа (ИФА) по заранее валидированной методике. Транспортировка из исследовательского центра была выполнена с соблюдением холодовой цепи не выше –20 °С. Анализ выполнен на автоматическом иммуноферментном анализаторе Personal Lab, производства Adaltis S.r.l., Италия.

Фармакодинамика. Количественное определение уровня глюкозы в крови в период ГЭК производили в образцах цельной венозной крови с помощью откалиброванных глюкометров StatStrip Glucose and β-Ketone Hospital Meter производства Nova Biomedical, США [15, 16].

До начала процедур исследования каждый доброволец подписал информированное согласие. Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации, принципами Надлежащей клинической практики и локальными регуляторными требованиями. Протокол исследования был одобрен Министерством Здравоохранения РФ (разрешение №124 от 19.02.2016), а также независимым этическим комитетом при клиническом центре ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (выписка протокола № 15 от 28.08.2017).

Принципы расчёта размера выборки. Ввиду того, что первичной целью исследования являлось сравнение

ФК и ФД свойств препаратов Ринсулин® Р и Хумулин® Регуляр у здоровых добровольцев, для расчёта размера выборки были использованы данные по среднему значению и стандартному отклонению первичных ФК показателей $AUC_{ins,0-t}$ и $C_{ins,max}$ и ФД показателей AUC_{GIR0-t} и GIR_{max} [17]. Расчёт размера выборки был выполнен для более вариабельного показателя.

Методы статистического анализа данных. Статистическую обработку данных и оформление результатов проводили с помощью пакетов программного обеспечения R 3.4.2. Площадь под кривой рассчитывали методом трапеций.

Статистический анализ выполнен в предположении о лог-нормальном распределении основных ФК и ФД параметров. Сравнение средних значений параметров для ТП и ПС проводили на основе мультипликативной модели, а доверительные интервалы строили для отношений соответствующих средних геометрических значений.

После проведения логарифмического преобразования исследуемые показатели анализировали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Дисперсионный анализ применяли для проверки гипотез о статистической значимости вклада различных факторов (различия между препаратами, различия между испытуемыми, последовательность введения препаратов, периоды исследования) в наблюдаемую вариабельность. Полученная с помощью дисперсионного анализа оценка остаточной вариации использована при расчёте доверительного интервала для отношения средних геометрических значений соответствующего параметра.

Процедура статистического сравнения состояла в вычислении параметрических двусторонних 90 % доверительных интервалов для ФК параметров и 95 % доверительных интервалов для ФД параметров для отношений соответствующих геометрических средних ТП и ПС.

Согласно регламентирующим стандартам, препараты считались эквивалентными, если 90 % доверительные интервалы для геометрических средних, вычисленных для индивидуальных отношений логарифмически преобразованных значений $AUC_{ins,0-t}$ и $C_{ins,max}$, и 95 % доверительные интервалы для геометрических средних, вычисленных для индивидуальных отношений логарифмически преобразованных значений AUC_{GIR0-t} и GIR_{max} , находились в пределах 80,00–125,00 % (0,80–1,25) [5, 11, 12].

Вторичные ФК параметры ($AUC_{ins,0-2}$, $AUC_{ins,0-4}$, $AUC_{ins,0-6}$, $t_{1/2}$, t_{max}) и ФД параметры (AUC_{GIR0-2} , AUC_{GIR0-4} , AUC_{GIR0-6} , $tGIR_{max}$, $tGIR_{lag}$) анализировали с помощью показателей описательной статистики.

Анализ нежелательных явлений проведён в виде описания случаев, а также градации их по степени тяжести и причинно-следственной связи с введением препаратов.

Результаты и их обсуждение

После прохождения скрининга в исследование было включено 20 здоровых добровольцев, соответствующих

критериям включения/невключения. Характеристика добровольцев представлена в табл. 1. Все субъекты закончили исследование в соответствии с протоколом, ни один субъект не исключён из анализа ФК и ФД свойств ИП.

Таблица 1

Демографическая и антропометрическая информация обо всех рандомизированных субъектах (среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n = 20$)

Показатель	Значения
Возраст (лет)	28,65 $\pm$ 5,40
Масса тела (кг)	77,45 $\pm$ 9,98
Рост (см)	180,95 $\pm$ 7,39
ИМТ (кг/м ²)	23,65 $\pm$ 2,75

Были рассчитаны показатели, подтверждающие качество ГЭК, основанные на результатах измерения уровня глюкозы в крови в течение ГЭК. Полученные результаты подтверждают удовлетворительное качество проведенных ГЭК (табл. 2).

На рис. 1 и в табл. 3 представлены усреднённые ФК кривые «концентрация—время» ТП и ПС в плазме добровольцев. Отмечена сопоставимость основных ФК характеристик. Так, $C_{ins,max}$ составила 155,02 $\pm$ 74,34 и 153,74 $\pm$ 60,43 мкМЕ/мл, а $AUC_{ins,0-t}$ — 605,09 $\pm$ 217,82 и 611,99 $\pm$ 242,89 (мкМЕ/мл) $\times$ ч, соответственно.

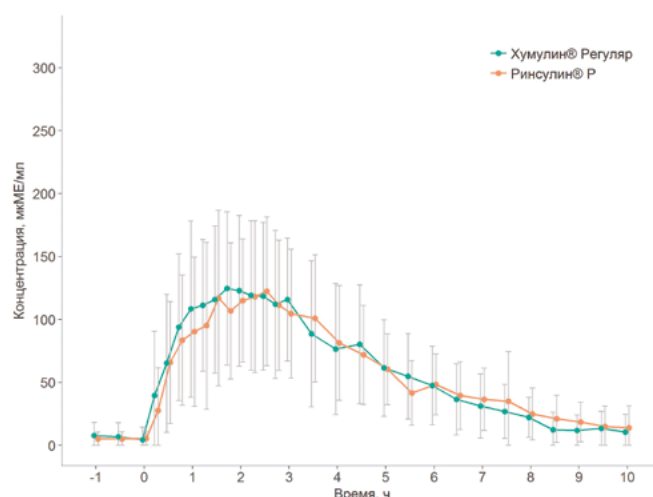


Рис. 1. Усреднённые фармакокинетические профили концентрации инсулина в плазме участников после подкожного введения тестируемого препарата Ринсулин® Р и препарата сравнения Хумулин® Регуляр ($n = 20$)

Точечные оценки индивидуальных отношений $AUC_{ins,0-t}$ (ТП)/ $AUC_{ins,0-t}$ (ПС) составила 99 %, а $C_{ins,max}$ (ТП)/ $C_{ins,max}$ (ПС) — 97 %. 90 % доверительные интервалы для геометрических средних отношений составили, соответственно, 88,61–111,52 % и 85,41–109,51 %, что находится в рамках допустимого диапазона (80,00–125,00 %).

Таблица 2

Параметры качества гиперинсулинемического эугликемического клэмпа (среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n = 20$)

Параметр	Ринсулин® Р	Хумулин® Регуляр
CV, %	6,07 $\pm$ 0,81	5,98 $\pm$ 0,80
Средний уровень удержания глюкозы, ммоль/л	4,99 $\pm$ 0,04	4,99 $\pm$ 0,05
Отклонение уровня глюкозы от цели, ммоль/л	0,26 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,04
Отклонение уровня глюкозы от допустимых границ, ммоль/л	0,0020 $\pm$ 0,0070	0,0005 $\pm$ 0,0022

Примечания: CV — коэффициент вариации, рассчитан как SD (глюкозы плазмы ммоль/л)/ mean (глюкозы плазмы ммоль/л); отклонение уровня глюкозы от цели, ммоль/л — отклонение уровня глюкозы от целевого уровня 5,6 ммоль/л, рассчитано как $mean | 5,6 - x_i |$, где x_i — результат измерения глюкозы плазмы в каждый момент времени; отклонение уровня глюкозы от допустимых границ, ммоль/л — отклонение уровня глюкозы от допустимых границ 5,04–6,16 ммоль/л ($5,6 \pm 0,56$ ммоль/л), рассчитано как $I_i = | 5,04 - x_i |$, $U_i = | 6,16 - x_i |$ (расстояние до нижней и верхней границы, соответственно), где x_i — результат измерения глюкозы плазмы в каждый момент времени, тогда расчётная величина равна $mean (z_i, t_i)$.

Таблица 3

Фармакокинетические параметры исследуемых препаратов, результаты оценки эквивалентности

Параметры	N	Ринсулин® Р (ТП) ¹	N	Хумулин® Регуляр (ПС) ¹	Отношение ТП/ПС [90 % ДИ] ²
$C_{ins,max}$, мкМЕ/мл	20	155,02 $\pm$ 74,34	20	153,74 $\pm$ 60,43	0,97 [85,41; 109,51]
$AUC_{ins,0-t}$, (мкМЕ/мл) $\times$ ч	20	605,09 $\pm$ 217,82	20	611,99 $\pm$ 242,89	0,99 [88,61; 111,52]
$AUC_{ins,0-2}$, (мкМЕ/мл) $\times$ ч	20	161,78 $\pm$ 88,29	20	180,73 $\pm$ 89,69	
$AUC_{ins,0-4}$, (мкМЕ/мл) $\times$ ч	20	374,38 $\pm$ 156,17	20	390,51 $\pm$ 162,61	
$AUC_{ins,0-6}$, (мкМЕ/мл) $\times$ ч	20	494,00 $\pm$ 184,55	20	519,86 $\pm$ 210,28	
t_{max} , ч	20	2,74 $\pm$ 1,49	20	2,50 $\pm$ 1,57	
$t_{1/2}$, ч	20	2,53 $\pm$ 3,12	193	1,76 $\pm$ 0,72	

Примечания: ¹ — результаты представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение; ² — представлено отношение геометрических средних, для отношения ФК параметров приведен 90 % ДИ; 3 — поскольку для вычисления $t_{1/2}$ требуется не менее 3 ненулевых убывающих точек, то для субъектов, у которых отсутствовали таковые, $t_{1/2}$ не рассчитывали.

Эти данные в совокупности с характеристиками кривых «концентрация — время» свидетельствуют о сопоставимости ФК ИП.

На рис. 2 и в табл. 4 представлены усреднённые ФД кривые «СИГ—время». Зафиксирована сопоставимость параметров действия ТП и ПС у здоровых добровольцев. Так, время между введением ИП и началом инфузии глюкозы ($tGIR_{lag}$) составило $25,8 \pm 12,6$ и $27,0 \pm 13,2$ мин, соответственно. Площади под кривыми

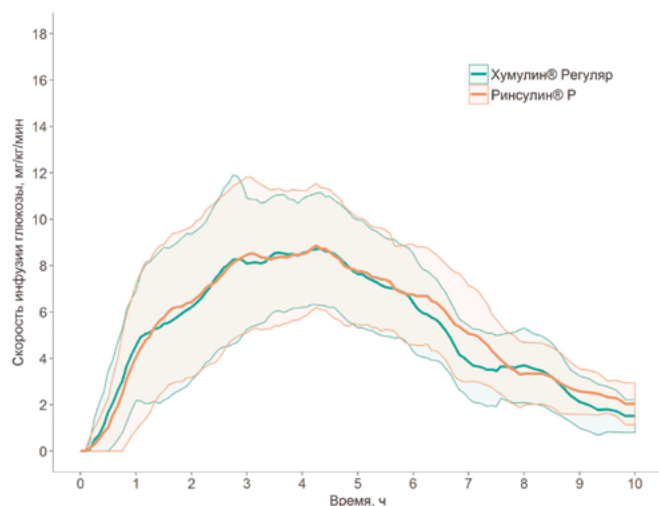


Рис. 2. Усреднённые фармакодинамические кривые «скорость инфузии глюкозы — время» после подкожной инъекции тестируемого препарата Ринсулин® Р и препарата сравнения Хумулин® Регуляр ($n = 20$)

AUC_{GIR0-t} составили $53,85 \pm 15,98$ и $51,98 \pm 13,77$ (мг/кг) $\times 60$, а максимальные СИГ GIR_{max} $10,11 \pm 2,78$ и $9,99 \pm 3,16$ мг/кг/мин, соответственно. Точечные оценки индивидуальных отношений AUC_{GIR0-t} (ТП)/ AUC_{GIR0-t} (ПС) и GIR_{max} (ТП)/ GIR_{max} (ПС) составили 102 % для обоих параметров. 95 % доверительные интервалы для геометрических средних отношений составили, соответственно, 93,48–112,29 % и 95,75–109,17 %, что находится в рамках допустимого диапазона (80,00–125,00 %). Значения коэффициентов внутрииндивидуальной вариабельности ФД параметров AUC_{GIR0-t} и GIR_{max} составили, соответственно, 13,86 и 9,89 %. Эти данные в совокупности с характеристиками кривых «СИГ—время» свидетельствуют о сопоставимости ФД эффектов ИП.

Сводная информация по НЯ представлена в табл. 5. В ходе проведения исследования серьёзных НЯ не наблюдалось. Ни один из испытуемых не прекратил участие в исследовании по причине развития нежелательного явления.

У 2 добровольцев (10 %) в группе ТП было зарегистрировано 2 НЯ: 1 НЯ было определено врачами-исследователями как имеющее возможную связь с введением ИП и 1 НЯ — как вероятную.

У 2 добровольцев (10 %) в группе ПС было зарегистрировано 2 НЯ: 1 НЯ было определено врачами-исследователями как не имеющее связи с введением ИП и 1 НЯ как имеющее вероятную связь.

Частота выявленных нежелательных явлений была одинакова в сравниваемых группах.

Таблица 4

Фармакодинамические параметры исследуемых препаратов, результаты оценки эквивалентности ($n = 20$)

Показатели	Ринсулин® Р (ТП) ¹	Хумулин® Регуляр (ПС) ¹	Отношение ТП/ПС [95 % ДИ] ²
AUC _{GIR0-1} , мг/кг × 60	53,85 ± 15,98	51,98 ± 13,77	1,02 [93,48; 112,29]
GIR _{max} , мг/кг/мин	10,11 ± 2,78	9,99 ± 3,16	1,02 [95,75; 109,17]
AUC _{GIR0-2} , мг/кг × 60	7,06 ± 4,28	7,29 ± 4,32	
AUC _{GIR0-4} , мг/кг × 60	22,96 ± 9,98	23,12 ± 9,63	
AUC _{GIR0-6} , мг/кг × 60	38,63 ± 13,86	38,64 ± 13,08	
tGIR _{max} , ч	4,09 ± 1,16	4,09 ± 1,31	
tGIR _{lag} , мин	25,8 ± 12,6	27,0 ± 13,2	
Примечания: ¹ — результаты представлены в виде среднего ± стандартное отклонение; ² — представлено отношение геометрических средних, для отношения ФД параметров приведен 95 % доверительный интервал (ДИ).			

Таблица 5

Нежелательные явления

	Ринсулин® Р ($n = 20$)			Хумулин® Регуляр ($n = 20$)		
	Количество субъектов (%)	Степень НЯ	Количество случаев	Количество субъектов (%)	Степень НЯ	Количество случаев
Нежелательные явления	2 (10,0)	Лёгкая	2	2 (10,0)	Лёгкая	2
		Средняя	0		Средняя	0
		Тяжёлая	0		Тяжёлая	0
		Всего	2		Всего	2

В настоящем исследовании были зафиксированы следующие виды НЯ:

- Связанные с введением ИП:

«Повышение активности КФК» (1 случай у 1 участника в группе ТП);

«Гипербилирубинемия» (2 случая у 2 участников по одному в каждой группе).

- Не связанные с введением ИП:

«Геморрагическая анемия» (1 случай у 1 участника в группе ПС).

Все НЯ были оценены врачами-исследователями как несерьёзные, полностью обратимые, лёгкой степени тяжести. Все НЯ завершились выздоровлением без применения медикаментозной терапии.

Все жизненно важные показатели и показатели, полученные с помощью лабораторных и инструментальных способов исследования, оставались в пределах нормы или вариантов нормы или имели клинически незначимые отклонения (кроме отклонений в рамках НЯ). Уровень ионов калия в крови оставался стабильным в течение исследования. Местных реакций на введение ИП не обнаружено.

В соответствии с регуляторными требованиями [5, 6, 11, 12] статистическая оценка эквивалентности ИП была проведена на основании укладывания 90 % доверительных интервалов отношений первичных ФК конечных точек ТП к ПС и 95 % доверительных интервалов отношений первичных ФД параметров ТП к ПС в заранее определённые границы эквивалентности. Границами эквивалентности служили рекомендованные Европейскими и отечественными требованиями к изучению биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный инсулин и аналоги инсулина — 80–125 %. В данном исследовании было выявлено, что доверительные интервалы для логарифмически преобразованных отношений значений параметра $C_{ins,max}$ составил 85,41–109,51 %, $AUC_{ins,0-t}$ — 88,61–111,52 %, GIR_{max} — 95,75–109,17 % и AUC_{GIR0-t} — 93,48–112,29 %. Это подтверждает высокое подобие ТП Ринсулин® Р оригинальному препарату.

При выполнении дисперсионного анализа ФК параметров $AUC_{ins,0-t}$ и $C_{ins,max}$ (логарифмически преобразованные данные) установлено, что значимый вклад в наблюдаемую вариабельность данных внесли факторы «Последовательность» ($p\text{-value} = 0,00242$ и $0,00004$, соответственно) и «Субъект» ($p\text{-value} < 0,00001$), вклад остальных факторов («Период» и «Препарат») был статистически незначимым ($p\text{-value} > 0,05$). При этом были получены значения остаточной вариации, равные 0,04396 и 0,05137 для $AUC_{ins,0-t}$ и $C_{ins,max}$, соответственно, которые в дальнейшем были использованы при расчёте доверительных интервалов для отношений средних значений рассматриваемых параметров.

При выполнении дисперсионного анализа ФД параметров AUC_{GIR0-t} и GIR_{max} (логарифмически преобразованные данные) установлено, что значимый вклад в наблюдаемую вариабельность данных внес

фактор «Субъект» ($p\text{-value} \leq 0,00001$), а для параметра GIR_{max} также «Последовательность» ($p\text{-value} = 0,00908$), вклад остальных факторов («Период» и «Препарат», а для параметра AUC_{GIR0-t} и «Последовательность») был статистически незначимым ($p\text{-value} > 0,05$). При этом получены значения остаточной вариации, равные 0,01903 и 0,00974, соответственно, для AUC_{GIR0-t} и GIR_{max} , которые в дальнейшем были использованы при расчёте доверительных интервалов для отношений средних значений рассматриваемых параметров.

Считается, что при относительно коротком промежутке между введениями препаратов и при адекватном периоде «отмывки» (значительно превышает период полувыведения препарата, который для человеческого инсулина составляет несколько минут, а продолжительность действия не более 8 ч), выявляемый статистически значимый фактор «Последовательность» является, скорее всего, как и фактор «Субъект», частью межиндивидуальной вариабельности (случайная рандомизация субъектов в две последовательности), и не влияет на оценку доверительного интервала, основанного на остаточной внутрииндивидуальной вариации, а значит и на вывод о биосимилярности препаратов.

Проанализированные ФК и ФД параметры сравниваемых препаратов были сопоставимы. Особую клиническую значимость имеет синхронное начало действия препаратов, время наступления максимального эффекта и продолжительность действия.

Качество проведённого ГЭК, определённого по степени подавления секреции собственного инсулина и уровню удержания нормогликемии в течение ГЭК, было удовлетворительным и сопоставимым между группами.

Ограничения исследования. При использовании популяции здоровых волонтеров было минимизировано влияние факторов сопутствующих заболеваний на показатели концентрации инсулина и глюкозы в плазме. Тем не менее, полученные данные на однородной выборке без сопутствующих факторов искажения можно экстраполировать на всю популяцию пациентов с СД.

Выводы

На основании проведённого двойного слепого рандомизированного сравнительного перекрестного исследования ФК и ФД препаратов Ринсулин® Р, раствор для инъекций, 100 МЕ/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и Хумулин® Регуляр, раствор для инъекций, 100 МЕ/мл («Лилли Франс», Франция) с использованием метода гиперинсулинемического эугликемического клэмпа на здоровых добровольцах ТП Ринсулин® Р и ПС Хумулин® Регуляр являются эквивалентными.

Сходность фармакологических (ФК/ФД) характеристик данных типов инсулинов позволяет экстраполировать эффективность референтного препарата Хумулин® Регуляр, раствор для инъекций, 100 МЕ/мл («Лилли Франс», Франция) на ТП Ринсулин® Р, раствор для инъекций, 100 МЕ/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия).

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции, дизайна исследования и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

Майоров А.Ю., Кокшарова Е.О., Мишина Е.Е. являются представителями клинического центра, проводившего описываемое клиническое исследование при финансовой поддержке ГК «ГЕРОФАРМ». Драй Р.В., Авдеева О.И., Беликова Т.М. являются сотрудниками ГК «ГЕРОФАРМ».

Выражение признательности.

Авторы выражают признательность сотрудникам аналитической лаборатории ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», специалисту по биомедицинской статистике Севастьяновой Юлии Александровне, руководителю проекта Афонькиной Олене Валерьевне, а также редакции журнала «Фармакокинетика и фармакодинамика».

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Майоров Александр Юрьевич

ORCID ID: 000-0001-5825-3287

SPIN-код: 4275-7779

д. м. н., профессор, зав. отделом прогнозирования и инноваций диабета Института диабета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России

Mayorov Alexander

ORCID ID: 000-0001-5825-3287

SPIN-code: 4275-7779

PhD, professor, Head Diabetes Forecasting and Innovation Division, Institute of Diabetes, Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Endocrinology, Ministry of Health of Russia

Авдеева Ольга Ильинична

Автор, ответственный за переписку

e-mail: olga.avdeeva@geropharm.com

ORCID ID: 0000-0002-6759-4283

SPIN-код: 2395-3691

к. фарм. н, медицинский писатель департамента клинических исследований ГК «ГЕРОФАРМ»

Avdeeva Olga

Corresponding author

e-mail: olga.avdeeva@geropharm.com

ORCID ID: 0000-0002-6759-4283

SPIN-code: 2395-3691

PhD in Pharmaceutical Science, medical writer, Department of Clinical Research, GEROPHARM

Кокшарова Екатерина Олеговна

ORCID ID: 0000-0001-9896-4681

SPIN-код: 335-3438

н. с. лаборатории клэмп-технологий Института диабета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России

Koksharova Ekaterina

ORCID ID: 0000-0001-9896-4681

SPIN-code: 335-3438

researcher, Laboratory of Clamp Technologies, Institute of Diabetes, National Medical Research Center for Endocrinology, Ministry of Health of Russia

Беликова Татьяна Михайловна

ORCID ID: 0000-0002-9865-6387

SPIN-код: 4450-8633

руководитель отдела клинических операций ГК «ГЕРОФАРМ»

Belikova Tatyana

ORCID ID: 0000-0002-9865-6387

SPIN-code: 4450-8633

руководитель отдела клинических операций ГК «ГЕРОФАРМ»

Мишина Екатерина Евгеньевна

ORCID ID: 0000-0002-5371-8708

SPIN-код: 2115-7697

н. с. лаборатории клэмп-технологий Института диабета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России

Mishina Ekaterina

ORCID ID: 0000-0002-5371-8708

SPIN-code: 2115-7697

researcher, Laboratory of Clamp Technologies, Institute of Diabetes, National Medical Research Center for Endocrinology, Ministry of Health of Russia

Драй Роман Васильевич

ORCID ID: 0000-0003-4594-6097

SPIN-код: 5271-0404

к. м. н., директор R&D ГК «ГЕРОФАРМ»

Bochkov Pavel

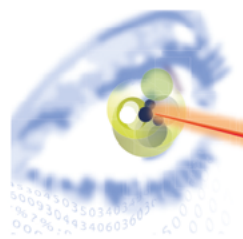
ORCID ID: 0000-0003-4594-6097

SPIN-code: 5271-0404

к. м. н., директор R&D ГК «ГЕРОФАРМ»

Литература / References

1. Diabetes Atlas. IDF, 2017.
2. Федеральный регистр больных сахарным диабетом. [Federal'nyj registr bol'nyh saharnym diabetom. [Internet] (In Russ).] URL: <http://diaregistry.ru> (дата обращения 03.2019).
3. King P, Peacock I, Donnelly R. The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *British journal of clinical pharmacology*. 1999;48(5):643–648.
4. Демидов Н.А., Мишра О.А. Эффективность и безопасность использования Ринсулина Р и Ринсулина НПХ в условиях амбулаторной практики // *РМЖ*. — 2016. — № 12. — С. 782–785. [Demidov NA, Mishra OA. Effektivnost' i bezopasnost' ispol'zovaniya Rinsulina R i Rinsulina NPH v usloviyah ambulatornojpraktiki. *RMJ*. 2016;12:782–785. (In Russ).]
5. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues (EMA/CHMP/BMWP/32775/2005_Rev. 1).
6. Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04 Rev. 1).
7. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev. 1).
8. Guideline on the clinical investigation of the pharmacokinetics of therapeutic proteins (EMA/CHMP/ 89249/2004).
9. Guideline on the investigation of bioequivalence (CPMP/EWP/QWP/1401/98).
10. Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins (EMA/CHMP/BMWP/14327/2006).
11. Решение № 89 от 3 ноября 2016 года "Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза", глава 15.7 «Доклиническая и клиническая разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный инсулин и аналоги инсулина». [Decision № 89 of Nov 3 2016 "Ob utverzhdenii pravil provedeniya issledovaniy biologicheskikh lekarstvennykh sredstv Evraziyskogo ekonomicheskogo soyuza", glava 15.7 "Doklinicheskaya i klinicheskaya razrabotka bioanalogichnykh (biopodobnykh) lekarstvennykh preparatov, soderzhashchih rekombinantnyj insulin i analogi insulina". (In Russ).]
12. Разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции генно-инженерный инсулин человека или аналоги инсулина человека // Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том IV. — М.: Полиграф-плюс; 2014. [Razrabotka bioanalogichnykh (biopodobnykh) lekarstvennykh preparatov, soderzhashchikh v kachestve farmatsevticheskoy substvantsii genno-inzhenernyy insulin cheloveka ili analogi insulina cheloveka. In: Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv. Vol. IV. Moscow: Poligraf-plyus; 2014. (In Russ).]
13. Heinemann L, Anderson JH. Measurement of insulin absorption and insulin action. *Diabetes Technol Ther*. 2004 Oct;6(5):698–718. DOI: 10.1089/dia.2004.6.698
14. Heise T, Zijlstra E, Nosek L, et al. Euglycaemic glucose clamp: what it can and cannot do, and how to do it. *Diabetes Obes Metab*. 2016 Oct;18(10):962–972. DOI: 10.1111/dom.12703
15. Rabiee A, Magruder JT, Grant C, et al. Accuracy and reliability of the Nova StatStrip® glucose meter for real-time blood glucose determinations during glucose clamp studies. *J Diabetes Sci Technol*. 2010 Sep 1;4(5):1195–1201. DOI: 10.1177/193229681000400519
16. Lindquist KA, Chow K, West A, et al. The StatStrip glucose monitor is suitable for use during hyperinsulinemic euglycemic clamps in a pediatric population. *Diabetes technology & therapeutics*. 2014;16(5):298–302.
17. Heinemann L, Weyer C, Rauhaus M, et al. Variability of the metabolic effect of soluble insulin and the rapid-acting insulin analog insulin aspart. *Diabetes Care*. 1998;21(11):1910–1914. DOI: 10.2337/diacare.21.11.1910



Издательство ОКИ

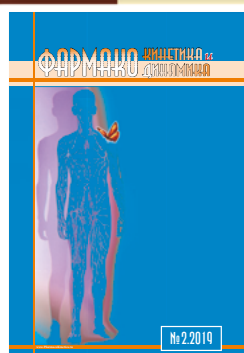
ООО «Издательство ОКИ» выпускает 4 периодических научных специализированных медико-фармацевтических журналов, предназначенных для врачей, провизоров, фармацевтов, специалистов НИИ, преподавателей и студентов медицинских и фармацевтических ВУЗов, организаторов здравоохранения, клинических исследователей, фармакологов, сотрудников фармацевтических компаний, служащих регулирующих органов, членов Комитетов по Этике.

Сайт издательства: www.izdat-oki.ru



Журнал «Качественная клиническая практика» публикует материалы по планированию и проведению клинических исследований лекарственных средств, фармакоэкономике, фармакоэпидемиологии, биомедицинской этике, фармаконадзору, которые используются в преподавательской работе во многих медицинских ВУЗах.

Сайт журнала: www.clinvest.ru



Журнал «Фармакокинетика и Фармакодинамика» освещает фундаментальные и прикладные аспекты доклинических и клинических исследований фармакокинетики, в частности терапевтического лекарственного мониторинга, фармакодинамического и биофармацевтического изучения препаратов, их взаимодействия, оценки их биодоступности и биоэквивалентности.

Сайт журнала: www.pharmacokinetica.ru



Журнал «Фармакогенетика и фармакогеномика» публикует оригинальные статьи о проведённых клинических, клинко-экспериментальных и фундаментальных научных работах, обзоры, лекции, описания клинических случаев, а также вспомогательные материалы по всем актуальным проблемам персонализированной медицины

Сайт журнала: www.pharmacogenetics-pharmacogenomics.ru



Журнал «Антибиотики и химиотерапия» освещает проблемы поиска и получения новых антибиотиков, ферментов, биологически активных веществ, а также вопросы экспериментальной химиотерапии бактериальных и вирусных инфекций.

Сайт журнала: www.antibiotics-chemotherapy.ru

**Тел.: +7 (910) 449-22-73;
e-mail: clinvest@mail.ru**



Предлагаем Вашему вниманию полноцветное качественное издание **«Включение лекарственных препаратов в ограничительные перечни: пошаговый алгоритм»** под общей редакцией Белоусова Д.Ю., Зырянова С.К., Колбина А.С., в соавторстве с Карповым О.И., Чебердой А.Е., Балыкиной Ю.Е.

О ЧЁМ ЭТА КНИГА?

Это невероятно полезный и компактный ресурс по подготовке Предложения на включение в ограничительные Перечни лекарственных препаратов. После прочтения этой книги процесс включения в Перечни сложится из разрозненных пазлов в единую картину.

Почему она достойна вашего внимания?

На страницах книги авторы профессионально, шаг за шагом, подробно и доходчиво объясняют методы сбора доказательной базы, рассказывают о методологии проведения сравнительной оценки эффективности и безопасности, клинико-экономических исследований и анализа влияния на бюджет, современных рекомендациях по подготовке Предложения на включение в ограничительные Перечни.

Кому следует её приобрести?

Издание предназначено для специалистов в области фармакоэкономики, оценки технологий здравоохранения, лекарственного обеспечения, внедрения лекарственных препаратов на российский фармацевтический рынок.

Приобрести книгу можно по:

тел. +7 (910) 449-22-73 или e-mail: eva88@list.ru

Выходные данные: Включение лекарственных препаратов в ограничительные перечни: пошаговый алгоритм / под общ. ред. Белоусова Д. Ю., Зырянова С. К., Колбина А. С. — М. : Издательство ОКИ : Буки Веди, 2019. — 252 с. : ил.
ISBN 978-5-4465-2555-3



230 исследований

220 публикаций

48 партнёров

Комплексная клинико-экономическая оценка лекарственных средств для включения в ограничительные перечни

- Оценка эффективности и безопасности

- систематический обзор
- мета-анализ
- не прямые и смешанные сравнения,
сетевой мета-анализ

- Разработка моделей принятия решений в MS Excel

- Локальная адаптация CORE-моделей

- Клинико-экономический анализ

- Анализ влияния на бюджет

- Подготовка Предложения на включение
в ограничительные перечни



Награждён в 2013 и 2014 гг. Всероссийской социальной премией в области организации здравоохранения, фармакоэкономики и рациональной фармакотерапии «Da.Signa»

