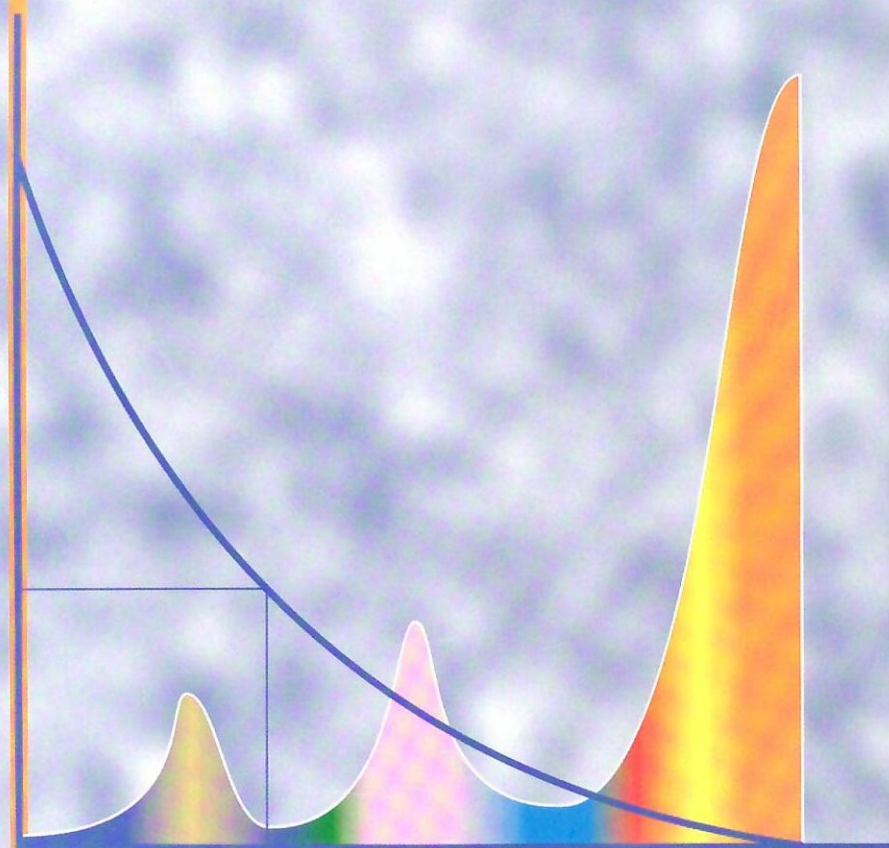


КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА



№1

2004



Поздравляем с юбилеем Роджера Джеллиффа!

Роджер Джеллифф, врач-кардиолог, в 1950 году закончил Гарвардский Университет, в 1954 году в Колумбийском Университете получил степень доктора медицины (M.D.). Работал в Университетском госпитале в Кливленде, а с 1961 года преподавал в медицинской школе Университета Южной Калифорнии. Там же в 1976 году получил звание профессора медицины.

Профессор Джеллифф, или Доктор Джеллифф, как обычно называют его коллеги, уже в 1967 году разрабатывал первую компьютерную программу для моделирования фармакокинетики сердечных гликозидов и индивидуализации их дозирования. В 1973 году он организовал в Университете Южной Калифорнии лабораторию прикладной фармакокинетики, где начал создавать пакет программ USC*PACK для популяционного моделирования и индивидуализации фармакотерапии. Работа по развитию и совершенствованию общих подходов ФК/ФД моделирования и программного обеспечения продолжается и в настоящее время. Так в лаборатории был разработан новый метод «Множественной модели» для расчета режимов дозирования с максимальной точностью. Последние годы лаборатория тесно сотрудничает с суперкомпьютерными центрами в Сан-Диего, Осло и Сингапуре по разработке специальных методов моделирования сложных нелинейных ФК/ФД моделей и моделей большой размерности, необходимых, например, для описания возникающих взаимовлияний препаратов при комбинированной терапии.

Доктор Джеллифф является организатором курса обучения «Фармакокинетика. Популяционное ФК/ФД моделирование. Индивидуализация дозирования», обучающие семинары он проводит в разных странах мира. С 2000 года семинар по этой тематике ежегодно организуется и в нашей стране. Читая лекции, доктор Джеллифф охотно делится глубокими знаниями, передает свой огромный опыт научной и практической работы слушателям: врачам, исследователям, студентам медицинских ВУЗов.

Редакционная коллегия журнала «Клиническая фармакокинетика» желает нашему американскому коллеге крепкого здоровья и новых успехов в этой сложной науке!

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

№1
2004 г.

Учредитель:

ОБЩЕСТВО
КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ

Главный редактор
Горьков В.А.

Редакционная коллегия:

Батурин В.А.
Белоусов Ю.Б.
Бондарева И.Б.
Глезер М.Г.
Гнеушев Е.Т.
Гуревич К.Г.
Роджер Джеллифф (США)
Жердев В.П.
Зиганшина Л.Е.
Кукес В.Г.
Леонова М.В.
Мирошниченко И.И.
Писарев В.В.
Пчелинцев М.В.
Раменская Г.В.
Сариев А.К.
Соколов А.В.
Стародубцев А.К.
Фирсов А.А.
Чистяков В.В.

Издательская группа:

Научный редактор – Бондарева И.Б.
Ответственные за выпуск –
Белоусов Д.Ю., Григорьев В.Ю.
Корректор – Пронина М.М.
Дизайн, верстка – Смоленцев А.И.

Подписано в печать 14.01.2004 г.

Типография Верже

Тираж 3 000 экз.

Адрес редакции:

117321, г.Москва, а/я 30

Тел./факс: (095) 111-51-00

e-mail: clinvest@mail.ru

Журнал «Качественная клиническая практика» зарегистрирован Комитетом РФ по печати 28.05.2001 г.

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №77-9142.
Журнал «Клиническая фармакокинетика» является приложением к журналу «Качественная клиническая практика»

Авторские материалы не обязательно отражают точку зрения редакции. Редакция не несет ответственности за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах.

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ

Введение в фармакокинетику
(Горьков В.А., Карамышева Е.И.) 2

ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ

Правила исследования биоэквивалентности лекарств
(Соколов А.В.) 5
Статистический анализ данных исследований биоэквивалентности лекарственных средств
(Бондарева И.Б.) 14
Определение азитромицина в плазме крови методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием
(Писарев В.В., Смирнова Л.Б., Москалева Н.Е., Зверков Ю.Б., Белоліпецкая В.Г., Суханов Я.В.) 22
Сравнительное фармакокинетическое исследование биоэквивалентности двух пролонгированных лекарственных форм метопролола
(Соколов А.В., Белоусов Ю.Б., Тищенко И.Ф.) 27

ПОПУЛЯЦИОННАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

Фармакокинетический анализ бимодальных дозозависимостей
(Гуревич К.Г.) 24
Популяционная фармакокинетика метотрексата: клинический мониторинг лечения острого лимфобластного лейкоза и лимфом у детей
(Сингин А.С.) 40

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ МОНИТОРИНГ

Рациональное дозирование лекарственных средств: история, настоящее, перспективы
(Мирошниченко И.И., Горшкова Е.В.) 42
Терапевтический лекарственный мониторинг противовирусных препаратов
(Белоусов Ю.Б., Гуревич К.Г., Сторожаков Г.И.) 47
Клинический случай применения ванкомицина по поводу MRSA-сепсиса у больного с терминальной недостаточностью трансплантата почки
(Денисова О.И.) 50

БЕЗОПАСНОСТЬ ЛЕКАРСТВ

Какие фосфолипиды «эссенциальнее»?
(Гуревич К.Г.) 52

ФАРМАКОЭКОНОМИКА

Фармакокинетическое обоснование преимуществ индивидуального дозирования аминогликозидов: анализ затрат и эффективности
(ван Лент-Эверс Н.А.И.М., Матьет Р.А.А., Гюс В.П., ван Хаут Б.А., Винкс А.А.) 58

СОДЕРЖАНИЕ

Введение в фармакокинетику

В.А. Горьков, Е.И. Карамышева

Научный центр психического здоровья РАМН, Москва

Лекарственные средства (ЛС) — синтетические, растительные и др. являются, качественно и количественно измеримыми и определяемыми модификаторами жизненных процессов. Фармакология способна обнаружить и объяснить биологические факторы и процессы, которые иным способом трудно заметить или различить. Среди влияющих на жизненные процессы химических и биохимических соединений в окружающей среде, ЛС обычно индуцируют измеримые события, экспозиция к которым характеризуется ограниченным существованием, в отличие от времени суток или года, температуры, влажности воздуха, шумов и др., действующих на нас непрерывно.

Фармакокинетика (ФК; от греч. «pharmakon» — лекарство и «kinetikos» — относящийся к движению) — наука о процессах, происходящих в живом организме с фармакологически активными веществами. Необходимость выделения ФК в самостоятельную дисциплину следует из определения фармакологии как науки о взаимодействии лекарственных средств (ЛС) с живыми организмами, подразумевающей как действие ЛС на организм (фармакодинамический фактор), так и действие организма на ЛС (фармакокинетический фактор).

Методическая основа ФК — количественный анализ и математическое моделирование кинетики изменения концентраций ЛС в биосредах организма, создание аналитических методов измерения микро- и нанограммовых концентраций ЛС и продуктов их биотрансформации (метаболизма) в сложных многокомпонентных биосредах и выделениях животных и человека. Первые исследования ФК относят к 1919–1924 гг., теоретические разработки — к 1930 г., монографии — к 1949–1963 гг., проблемный обзор на английском языке — к 1961 г., на русском — к 1967 г. В настоящее время публикации по ФК исчисляются десятками тысяч, а по темпам и объемам публикаций ФК опережает все дисциплины, связанные с созданием, испытанием и применением ЛС.

Предмет исследования ФК. Процессы, происходящие с ЛС в организме, делят на категории по степени сложности. Скорость и обратимость взаимодействий молекул ЛС и организма определяются химическими связями, прочность которых убывает в ряду: ковалентные, ионные, ион-дипольные, диполь-дипольные, водородные, гидрофобные, вандер-ваальсовы. Необратимость взаимодействий и цитотоксичность характерны в основном для ковалентных связей.

Из простых взаимодействий молекул ЛС и организма состоят сложные — поступление ЛС в кровь из места введения, распределение по органам и тканям, биотрансформация до активных и/или индифферентных метаболитов и экскреция с выделениями. Их кинетика составляет предмет исследования фундаментального направления ФК, цель которого — выяснение природы взаимодействий ЛС, а задачи — поиск зависимости от свойств ЛС и организма. Достижение цели должно

привести к прогнозу картины поведения ЛС в организме. В результате исследований появилась возможность решения прикладных задач, связанных с избирательностью действия, управлением ФК при лечении или экстремальных ситуациях (например, детоксикация), созданием оптимальных по эффективности и безопасности ЛС и лекарственных форм (ЛФ) этих ЛС.

Для обработки и интерпретации данных ФК применяют методы математического моделирования, начиная с выбора структурной схемы моделируемого явления на уровне упрощения реальной системы. В частых моделях схему «организм/лекарство» рассматривают как совокупность абстрактных частей или камер, между которыми и внутри которых происходят процессы распределения, превращения (метаболизма) и выведения ЛС.

При пропорциональности скоростей этих процессов концентрациям или количествам изучаемого вещества в части (линейная кинетика), где процесс происходит, кинетика изменения концентраций равна сумме экспонент по числу частей модели, параметры равны предэкспоненциальным множителям, показатели экспонент — количественным характеристикам процессов. Судить о количестве частей или их соответствии реальным системам организма и оценивать параметры отдельных процессов в каждой части по единственной кривой ФК ЛС в образцах крови и выделениях сложно и ненадежно при малом числе измерений, и на смену частевым моделям пришли аналоги, более адекватные целям и задачам исследований ФК.

Для фундаментального направления созданы модели физиологического перфузионного типа, где рассматриваются реальные органы и ткани в их взаимосвязи через артериальное и венозное кровоснабжение.

Параметры модели соответствуют объему органов, скоростям кровотока через них, коэффициентам распределения ЛС между кровью и тканями, а метаболическая и экскреторная активность органов оценивается экспериментально или берется из таблиц. Реализация моделей происходит при компьютерном решении системы множества описывающих ее уравнений материального баланса.

Для оценочных, сравнительных и прогностических задач прикладного направления используются методы

теории систем, рассматривающих систему организм-ЛС как целое («черный ящик») и применяющих в интерпретации кинетических данных уравнения материального баланса или теории вероятностей. В начальном варианте, в рамках линейной кинетики, предполагается равенство потоков или скоростей поступления и выведения ЛС после однократного приема или инъекции ЛС, а также на фоне длительного введения с постоянной скоростью или повторяющегося дозирования:

$$F \cdot D = Cl \cdot AUC; F \cdot D / T = Cl \cdot C_{ss},$$

где D — доза ЛС, AUC — площадь под кинетической кривой изменения концентрации ЛС в крови, плазме или сыворотке, T — интервал между дозами, C_{ss} — равновесная концентрация ЛС в крови при длительном введении с постоянной скоростью, Cl — клиренс, а F — степень биодоступности.

При внутрисосудистом введении $F=1$. Для внесосудистых или энтеральных введений биодоступность ЛС оценивается сравнением площадей под кинетическими кривыми изменениями концентрации относительно внутрисосудистого введения, а значения клиренса вычисляются по ранее приведенным уравнениям.

Физиологический клиренс (CL — поток, очищение) — количественная характеристика способности организма к выведению ЛС путем метаболизма и/или экскреции с выделениями. Его величина не может быть выше потока крови через выводящие органы, а знание этой величины позволяет прогнозировать индивидуальные дозы и интервалы, обеспечивающие известное терапевтическое значение равновесной концентрации. От соотношения клиренса и кажущегося объема распределения (V_d) ЛС в организме зависит скорость выведения ЛС, а также скорость достижения равновесного терапевтического уровня ЛС в крови:

$$k = Cl / V_d; T_{1/2} = 0,7 (V_d / Cl),$$

где k — константа скорости элиминации, связанная с периодом полувыведения ($T_{1/2}$) соотношением обратной пропорции (формулы справедливы в рамках линейной кинетики и для препаратов достаточно быстро распределяющихся в организме, чье поведение может быть описано однокамерной моделью).

Две эти формулы позволяют оценить кажущийся объем распределения ЛС, а по значению $T_{1/2}$ можно вычислить, что за $6 \times T_{1/2}$ процесс пройдет на 99%, то есть практически закончится.

Вероятностный подход рассматривает ФК-графики как кривые плотности распределения молекул ЛС по времени их пребывания в анализируемой среде и применяет для их анализа метод расчета статистических моментов нулевого (AUC), первого и второго порядков (среднее и дисперсия), на основании которых оценивается среднее время удержания (MRT — Mean Residence Time), клиренс (CL — Clearance) и объем

распределения (Volume of Distribution).

Основные процессы фармакокинетики. Для решения прикладных задач клинической ФК, таких как общая ФК-характеристика новых ЛС и поиск зависимости эффектов от концентрации их активных форм в месте действия, достаточно ограничиться тетрадой процессов: поступления, распределения, биотрансформации (метаболизма) и выведения.

От их эффективности зависит действующая концентрация, определяющая величину эффектов, и эти процессы направленно регулируются выбором путей и режимов введения ЛС. Существуют методические ограничения прижизненной доступности для анализа крови и выделений, что дает возможность оценить только эти процессы. Выделение сложных процессов в качестве «основных» справедливо для прикладных исследований и носит скорее вынужденный (ограниченные возможности получения измерительной информации), нежели принципиальный характер, поскольку основными являются межмолекулярные или простые процессы, из которых они состоят.

Фармакокинетические детерминанты эффектов. Известны пять фармакокинетических детерминантов эффекта, значимо определяющих его величину:

1. Концентрации ЛС, влияющие на функции центральной и периферической нервной системы в каждый момент времени после однократного введения, однозначно связаны с нейромышечными эффектами. К их числу относятся мышечные релаксанты, аминокликозиды, галлюциногены, психостимуляторы, алкоголь и др. Существование взаимосвязи обусловлено высокой скоростью проявления эффекта путем обратимого взаимодействия с рецепторами и быстрым обменом ЛС между кровью и местом действия, в результате чего лимитирующей стадией биологического действия ЛС становится изменение его концентрации в крови.

2. Максимальное значение действующей концентрации может детерминировать (определять) величину эффекта из-за медленной диссоциации комплекса «ЛС-рецептор» или более медленного выведения из места действия по сравнению с выведением из крови. Первое справедливо для противоопухолевых веществ интеркалирующего типа, второе — для некоторых бензодиазепинов, снотворных и релаксантов. Во всех случаях длительность действия определяется максимумом содержания ЛС в месте действия, пропорциональным максимуму содержания ЛС в крови.

3. Площадь под кинетической кривой концентрации ЛС является удобной мерой экспозиции всего организма или его отдельных систем к активному ЛС, поскольку пропорциональна как величине концентрации ЛС в крови, так и времени удержания ЛС, чем определяется конечный эффект ЛС, его терапевтическое или токсическое действие.

4. Скорость достижения эффективной концентрации определяет величину эффекта ряда рецепторно действующих психотропных ЛС — амфетаминов, бензодиазепинов и др. Эту зависимость можно объяснить отрицательным кооперативным эффектом взаимодей-

ствия ЛС с рецепторами, т.е. так называемой «острой адаптацией». Эффектам такого типа свойственна более высокая активность при внутрисосудистых введениях по сравнению с внесосудистыми введениями существенно больших доз.

5. Время превышения или поддержания эффективной концентрации детерминирует величину эффекта многих анестетиков, снотворных, химиотерапевтических и других ЛС. Для первых это время определяется врачом, а для химиотерапевтических агентов должно превышать время генерации патогенных микроорганизмов или опухолевых клеток. Наличие эффективной концентрации ЛС в крови, выше которой эффект не растет, а ниже — падает, связывают с насыщением процессов ферментативного ингибирования, рецепторного связывания и/или активного транспорта в клетки-мишени и др.

Таким образом, в проблеме фармакокинетической обусловленности эффекта ЛС вместо абстрактного понятия «концентрация» появляется конкретное — «фармакокинетический детерминант эффекта», тип которого зависит в большей степени от механизма действия ЛС, соответствующего данному эффекту, в связи с чем необходимо отметить несколько очевидных аспектов этой новой концепции.

Из нее следует, например, что один и тот же эффект может определяться разными детерминантами: противоопухолевый — временем превышения эффективной концентрации для антиметаболитов, максимальным значением действующей концентрации — для антибиотиков интеркалирующего типа и площадью под кинетической кривой (степенью биодоступности) — для алкиляторов. Разными ФК-детерминантами могут определяться разные эффекты одного и того же вещества: для типичного нейролептика аминазина, например, возможны все типы — мидриатический эффект зависит в наибольшей степени от действующей концентрации и изменяется синхронно с ней, ретинопатический — обусловлен ее максимумом, экстрапирамидный — площадью под кинетической кривой (степенью биодоступности), антипсихотический — скоростью достижения эффективной концентрации, седативный — временем ее превышения. Вполне возможно, что знание детерминантов поможет прогнозировать оптимальные пути и режимы введения новых ЛС, для которых фармакокинетический детерминант, например, максимален, а токсический — минимален.

Отметим, что понятия фармакокинетических компонентов и детерминантов не эквивалентны: фармакокинетический компонент может включать более одного детерминанта в определенной функциональной взаимосвязи. Идентифицировать тип детерминанта теоретически возможно методом фракционирования дозы, поскольку при введении фиксированной дозы в один или два приема площадь под кинетической кривой не меняется, максимальное значение концентрации ЛС снижается, а время удержания выше эффективного значения возрастает.

Выбор лекарственной формы, пути и скорости введения ЛС — реальный и доступный путь создания оптимального профиля изменения концентрации активных форм ЛС в крови и месте действия. При внутрисосудистом введении ЛС поступает в системное кровообращение, а скорость введения и, следовательно, эффективность нетрудно регулировать, применяя болюсную инъекцию, инфузию с постоянной или переменной скоростью и др. Перечень лекарственных форм, путей и способов введения ЛС достаточно велик, а их специфические особенности изучаются в рамках фармаки.

Наиболее распространен (но и сложен!) пероральный путь введения в растворах, таблетках, капсулах, порошках и др. из-за множества зависимостей от факторов ЛС (плотность, растворимость, pH и др.) и организма больного. Движущей силой поступления и распределения ЛС является разность концентраций свободного, несвязанного с биомакромолекулами ЛС, а степень распределения зависит от их сродства. Возможно также избирательное поступление активным транспортом, если переносится нейтральная форма ЛС.

Биотрансформация (метаболизм) — процесс химического превращения ЛС с образованием фармакологически активных (и токсичных в том числе!) или индифферентных продуктов — метаболитов. Образование неактивных метаболитов можно рассматривать и как выведение или детоксикацию. Метаболиты, как правило, более полярны и водорастворимы. Биотрансформация насыщаема: при высоких концентрациях ЛС ее удельная скорость снижается вплоть до постоянного значения, например, для этанола.

Экскреция с выделениями — мочой, желчью, потом, слюной и др. также зависит от скорости доставки ЛС в экскреторный орган и от активности собственно экскреторных систем. Почечная экскреция определяется совокупностью трех основных процессов: 1) гломерулярная фильтрация; 2) активная секреция в просимальной части извитых канальцев; 3) тубулярная реабсорбция.

Скорость фильтрации прямо пропорциональна концентрации свободного ЛС в плазме, активная секреция характеризуется наличием насыщаемого транспорта для анионов, катионов и амфотерных соединений.

Заключение. Развитие фармакокинетики как самостоятельной дисциплины на современном этапе обусловлено новыми достижениями в фармакологии, совершенствованием методов аналитической химии, появлением все более «интеллектуальных» компьютерных программ для математического моделирования. В этой статье в самом общем виде сформулированы основные проблемы, изучаемые в рамках теоретической и прикладной фармакокинетики. Все эти вопросы планируется более подробно обсуждать на страницах этого нового журнала.

Правила исследования биоэквивалентности лекарств

А.В. Соколов

Кафедра клинической фармакологии с лабораторией фармакокинетики РГМУ, г. Москва

Известно, что большая часть продаваемых в нашей стране лекарств являются не оригинальными препаратами, а их хорошо или плохо воспроизводимыми аналогами. Такие копии лекарственных препаратов называются дженериками (от англ. — Generic). Крупные фармацевтические фирмы в разработку новых лекарств вкладывают огромные средства — сотни миллионов долларов. Это одна из причин высокой стоимости препаратов. Существуют компании, специализирующиеся на выпуске воспроизводимых по лицензии (так же отнюдь не дешевых) средств, соблюдая в точности регламент производства, контроль за которым осуществляется под надзором фирм-разработчиков. Однако, есть большое количество фармацевтических производств, выпускающих лекарственные препараты без покупки дорогостоящей лицензии, а, следовательно, не всегда способных гарантировать качество препаратов.

Чтобы оказать оптимальное терапевтическое действие, активная субстанция должна быть доставлена в место своего действия в эффективной концентрации в течение желаемого периода. Проникновение лекарства в организм или, иначе говоря, биодоступность активной субстанции должна быть известна и воспроизводима. Особенно это касается случаев, когда одна лекарственная форма продукта заменяется другой. Оценка биоэквивалентности (или фармакокинетической эквивалентности) лекарственных средств (ЛС) в настоящее время считается одним из основных видов медико-биологического контроля качества дженериков — ЛС, содержащих одно и то же лекарственное вещество в одинаковой дозе и в той же лекарственной форме, что и оригинальное ЛС.

Для того чтобы врач, назначающий лекарство пациенту, был бы уверен в эффективности и адекватности препарата ему необходимо иметь на руках какое-либо свидетельство или сертификат качества данного препарата. Если идет речь об оригинальном препарате, к тому же разработанным хорошо известной фармацевтической компанией, то тогда достаточно прочитать аннотацию, прилагаемую к каждой упаковке препарата или заглянуть в любой солидный медицинский справочник, которые издаются сейчас в достаточном количестве. В большинстве же случаев врачу приходится назначать не оригинальный препарат, а его воспроизводимый аналог. Если идет речь о препаратах, производящихся фирмами различных стран по лицензии известных фармацевтических компаний, тогда можно вполне положиться на тот контроль качества, который осуществляется или может осуществляться фирмами-разработчиками оригинальных лекарств. В этом случае фирма-разработчик гарантирует качество препарата, производимого по ее лицензии. Однако стоимость таких препаратов практически равна или незначительно отличается от стоимости оригинальных лекарств. Мы же часто встречаемся в продаже с препа-

ратами, имеющими одинаковые международные непатентованные названия, но обладающие часто не одинаковой терапевтической эффективностью. Это объясняется тем, что технологический уровень производства в некоторых странах, импортирующих нам лекарства, оставляет желать лучшего.

В состав лекарственной формы помимо основного действующего вещества — лекарственной субстанции входят различные ингредиенты (наполнители, полимерные пленки, сахара и т.п.), замена которых изменяет некоторые фармакокинетические параметры при приеме данного препарата. Кроме того, лекарственная форма препарата так же может иметь свое значение для достижения того или иного фармакологического эффекта. Это не говоря уже о том, что изменение технологии производства (изменение условий прессования, влажности и т.п.) практически наверняка несет за собой изменение свойств (как правило, ухудшение) и качества препарата. В подобных случаях проведение обычных контрольных операций (исследования на растворимость, распадаемость, количественное соответствие и т.д.) не может дать никакой дополнительной информации об эффективности исследуемого препарата. Проведение полномасштабных клинических испытаний, конечно же, может дать ответы на все возможные вопросы по соответствию сравниваемых лекарств, однако стоимость и длительность подобных исследований таковы, что практически исключена возможность их проведения. Во всем мире, и наша страна не является исключением, в подобных случаях проводятся исследования по биоэквивалентности дженериков. Исследования биоэквивалентности позволяют сделать обоснованные заключения о качестве сравниваемых препаратов по значительно меньшему объему первичной информации и в более сжатые сроки, чем при проведении полномасштабных клинических испытаний (от момента постановки задачи, составления программы исследования по биоэквивалентности

до получения окончательных результатов, оформленных в виде отчета установленной формы, проходит примерно месяц). Стоимость подобных исследований хотя и довольно высока, но не идет ни в какое сравнение со стоимостью проведения полномасштабных клинических испытаний. Финансирование таких исследований осуществляет, как правило, либо фирма-изготовитель препарата, либо компания, решившая зарегистрировать данный препарат с целью дальнейшей продажи.

Что такое биоэквивалентность? Прежде, чем рассматривать последовательность проведения подобных исследований, необходимо определиться с некоторыми основными вопросами употребляемой терминологии. Что такое биоэквивалентность лекарств? Какие основные параметры препаратов сравниваются? На основании каких математических и статистических выводов принимается решение о биоэквивалентности препаратов? Кто участвует в проведении подобных исследований? Кто является объектом подобных исследований? Какие основные документы необходимы для проведения таких исследований? Какие методы применяются в данных исследованиях? Наконец, кто проводит такие исследования?

Эквивалентность лекарственных препаратов можно рассматривать с различных точек зрения. Считается, что лекарство терапевтически эквивалентно другому лекарству, если оно содержит ту же активную субстанцию и, будучи введено тем же субъектам, показывает одинаковую эффективность и токсичность, что и продукт, эффективность и токсичность которого были ранее установлены. Лекарственные продукты являются фармацевтическими эквивалентами, если они содержат одинаковое количество одной и той же активной субстанции в тех же дозировках. Фармацевтическая эквивалентность необязательно подразумевает биоэквивалентность, так как различия в сопутствующих веществах или технологии производства могут привести, например, к значительно более быстрому всасыванию или элиминации активного вещества. Иногда путают понятия биоэквивалентность и биодоступность, поэтому имеет смысл определиться в этих терминах. Два лекарственных вещества считаются биоэквивалентными, если различия в их биодоступности после введения в одной и той же молярной дозе не превышают заранее установленные пределы. Под биодоступностью понимается степень и скорость поступления активной субстанции из лекарственной формы в системный кровоток.

Как проводятся исследования по биоэквивалентности. Комиссией по клинической фармакологии и этическим аспектам Фармакологического Государственного Комитета России разработаны методические указания по проведению качественных клинических исследований по биоэквивалентности лекарств, основные положения которых, мы хотели бы привести в данной работе.

После того, как фирма — производитель изъявила желание зарегистрировать лекарственный препарат Фармакологический государственный комитет (ФГК) Минздрава России принимает решение о необходимости проведения исследований по биоэквивалентности представленного препарата в сравнении с уже зарегистрированным и хорошо известным препаратом в одной и той же дозе на здоровых добровольцах или, в некоторых случаях, больных, которым показано исследуемое ЛС (онкологические, ВИЧ инфицированные, наркоманы и т.п.). Заказчик обеспечивает финансирование проводимого исследования (оплата добровольцев, исследователей, страхового полиса).

Такие исследования проводятся в лицензированных фармакокинетических лабораториях или центрах, технически серьезно оснащенных и обладающих хорошо подготовленным научным персоналом, владеющим современными методами анализа лекарств в биологических объектах, в лечебных учреждениях наделенных лицензией на работу со здоровыми добровольцами. Как правило, исследование проводится на 12 здоровых добровольцах. В случаях, когда получаемые фармакокинетические параметры имеют большой межиндивидуальный разброс, количество добровольцев может быть увеличено до 18 или 24 человек. В качестве здоровых добровольцев могут привлекаться лица обоего пола в возрасте от 18 до 55 лет. Масса тела добровольцев не должна отклоняться более чем на 20% от идеальной массы тела для данного пола, возраста и роста. Запрещено проведение исследований биоэквивалентности у несовершеннолетних, беременных и кормящих женщин, у лиц, страдающих хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой и нейроэндокринной системы, печени, почек, у лиц, страдающих аллергическими заболеваниями, наркоманией, алкоголизмом (кроме тех случаев, когда исследуемый препарат показан именно данной группе больных).

Что должны знать добровольцы? Каждый доброволец должен знать цель проведения исследований, их длительность, к какой фармакологической группе относится препарат, пути введения препарата и дозу, механизм его действия, показания к применению, возможные нежелательные эффекты, условия отбора и количество отбираемой крови, ограничение в диете во время исследований, условия страхования. Информация, полученная каждым добровольцем в ходе исследования, не должна быть предана огласке. Все это формулируется в информированном согласии, которое подписывает доброволец. Далее на каждого добровольца заводится индивидуальная карта, где указывается все его паспортные данные, номера телефонов, медицинский анамнез. Перед проведением исследования проводится диспансеризация добровольцев, в ходе которой проводятся: врачебный осмотр, клинический анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, анализ крови на ВИЧ, сифилис, вирусный гепатит, для женщин — тест на беременность. Клинический блок,

где проводятся подобные исследования, должен включать палаты для проживания добровольцев, процедурную, столовую, комнату отдыха, душевую и туалет. В ходе исследования добровольцы должны получать стандартное, доброкачественное, сбалансированное питание, в котором исключена жирная и жареная пища и напитки, содержащие кофеин. Каждый доброволец перед проведением исследования должен быть застрахован. Страхование производится любой уполномоченной страховой компанией, имеющей соответствующую лицензию. В страховом полюсе должны быть оговорены практически все возможные нежелательные последствия, которые могут возникнуть при проведении подобных исследований. Стоимость страхового полюса и страхового вознаграждения в страховом случае заранее согласовывается между страховой компанией, фирмой-спонсором и добровольцем. Страховой полюс оплачивается фирмой-спонсором, или заказчиком проведения подобного исследования до начала исследования.

Кто проводит исследования по биоэквивалентности? Исследователь должен иметь определенную теоретическую и практическую подготовку, достаточный опыт работы для четкого выполнения своих обязанностей по правильному проведению исследования. Желательно, чтобы он имел сертификат об окончании специальных курсов. Исследователь должен быть хорошо знаком со всеми информационными материалами по исследуемому ЛС. В бригаду исследователей включают врачей-клиницистов и медицинских сестер, контролирующих состояние здоровья добровольцев, соблюдение режима, установку катетеров, отбор образцов крови и ее предварительную обработку, химика-аналитика и лаборантов, осуществляющих разработку и проведение анализа образцов крови на содержание препарата, специалиста — фармакокинетику, производящего расчет фармакокинетических параметров и составляющего окончательный отчет о проведенном исследовании, математика, который проводит статистическую обработку полученных данных. Медицинское обслуживание исследуемых добровольцев проводится врачом-исследователем, который отвечает за все медицинские вопросы, возникающие в плановом или экстренном порядке у исследуемого (добровольца) в течение всего периода исследования. Во время исследования врач-исследователь следит за тем, чтобы испытуемому оказывалась необходимая диагностическая и лечебная помощь в случае развития любых нежелательных явлений.

Врач-исследователь обязан соблюдать все права испытуемого, который принимает участие в проводимом исследовании. Наличие блока интенсивной терапии является обязательным требованием к проведению исследований биоэквивалентности на добровольцах.

Как проводятся исследования по биоэквивалентности? Исследования биоэквивалентности проводятся в соответствии с программой, которая представляется в

комиссию по клинической фармакологии и этическим аспектам ФГК. После одобрения комиссией программа утверждается ФГК. В программе должны быть отражены место проведения испытаний, сведения об исследуемых препаратах, сведения об испытуемых, их число, план рандомизации, дозы и режимы дозирования препаратов, биоматериал, в котором предполагается определять концентрацию, схему отбора проб, сведения об аналитическом методе, основные фармакокинетические параметры, методы расчета фармакокинетических параметров и статистической обработки полученных данных. Исследование по биоэквивалентности дженерика и препарата сравнения проводится в одинаковых дозировках. Если для регистрации заявлено несколько лекарственных форм одного препарата, исследование биоэквивалентности проводится для каждой заявленной формы.

Интервал времени между приемом исследуемого препарата и препарата сравнения (период «отмывки») зависит от длительности циркуляции лекарственного вещества в организме, определяется периодом полувыведения ($T_{1/2}$), и должен составлять не менее $6 T_{1/2}$. Биологическим материалом, используемым для определения концентрации ЛВ, может быть плазма, сыворотка или цельная кровь. Кровь забирается из локтевой (обычно) вены через кубитальный катетер. Пробирки для отбора проб должны иметь соответствующую маркировку с указанием шифра испытуемого, номера пробы и название препарата. Периодичность отбора проб у испытуемого определяется формой кривой «концентрация ЛВ — время» препарата сравнения. Временной отбор проб должен обеспечивать получение нескольких точек для каждого фрагмента фармакокинетической кривой — не менее 3 — для фазы первоначального возрастания концентрации, 4–5 точек на максимуме всасывания и не менее 3-х на фазе ее снижения.

Общая продолжительность наблюдения за концентрацией лекарственного средства в системном кровотоке при однократном его приеме должна составлять не менее 4-х периодов полувыведения изучаемого лекарственного вещества.

Длительность наблюдения считается приемлемой, если для усредненного фармакокинетического профиля величина площади под кривой «концентрация — время» в пределах от нуля до момента отбора последней пробы составляет не менее 80% от площади в пределах от нуля до бесконечности.

При высокой степени пресистемной элиминации лекарственного средства, либо если оно не обнаруживается в крови, целесообразно определить концентрацию основного метаболита. При изучении биоэквивалентности лекарственного средства, являющегося пролекарством, необходимо определять только концентрацию активного метаболита.

Методы определения лекарств в биологических объектах. Современное состояние уровня фармакокинетических исследований во многом основывается на

применении самых совершенных методов определения концентраций лекарственных препаратов в биологическом объектах. Правильный выбор метода определения концентрации во многом определяет успешное решение всей задачи исследования. Для определения концентрации ЛВ в плазме, сыворотке или цельной крови могут быть использованы различные физико-химические, иммунологические, микробиологические и др. методы, отвечающие современным требованиям: избирательность, высокая чувствительность, точность, воспроизводимость. Целесообразно использовать те методы определения концентрации лекарственных средств, которые были применены создателями при описании кинетических параметров оригинального лекарственного средства и опубликованы в соответствующей литературе. Если предлагается другая методика, необходимо обосновать ее применение и представить метрологические характеристики.

Существует большое число самых разнообразных методов определения концентрации ЛВ в биологических объектах: микробиологические, спектрофотометрические, поляриметрические, иммунологические (радиоиммунные, иммуноэнзимные и др.), радиоизотопные, хроматографические и т.п. методы, основанные на различных физико-химических свойствах исследуемых веществ. Все названные методы достаточно хорошо описаны в мировой литературе и широко применяются при проведении фармакокинетических исследований. Безусловно, каждый метод определения концентрации обладает определенными достоинствами и недостатками. По требованиям, предъявляемым к определению концентрации ЛВ, можно выделить несколько наиболее распространенных методов.

Первенство здесь занимают различные иммунологические методы, к безусловным достоинствам которых можно отнести еще и относительную простоту проведения непосредственных измерений. Данные методы основаны на взаимодействии специфических белковых антител (антисывороток) с анализируемым веществом, выступающего в роли антигена. Чем больше концентрация вещества-антигена, тем больше образуется комплекса антиген-антитело. Для количественного анализа процесса этого комплексобразования применяют два подхода: с предварительным отделением комплекса (гетерогенные методы) или без его отделения (гомогенные методы). В том и другом случае необходимо определить, сколько вещества-антигена оказалось связанным с антителом. Для этого используют общий принцип. Пробу биологической жидкости с неизвестной концентрацией анализируемого вещества добавляют к сыворотке, в которой белок-антитело связан в комплекс с тем же веществом (чаще с его модификацией), но так или иначе меченным. Вещество из анализируемой пробы вытесняет из комплекса меченый аналог тем больше, чем выше концентрация вещества в пробе. Определив, сколько меченого аналога оказалось вытеснено, можно рассчитать искомый уро-

вень вещества в пробе. Иммунологические методы различаются по видам метки в меченом аналоге анализируемого вещества: радиоактивная метка, свободно-радикальная метка, флюоресцентная метка, энзимная и т.д. Явными преимуществами иммунологических методов является высокая чувствительность определения (10^{-11} г), хорошая селективность, простота проведения анализа, относительно малый объем образца крови для проведения анализа (50–100 мкл), экспрессность. Особенно важно отметить применение таких методов при определении малых количеств вещества. Так, например, при исследовании биоэквивалентности такого широко применяемого препарата как эналаприл возможно применение только двух способов анализа — радиоиммунного и хромато-масс-спектрометрического, так как максимальная концентрация препарата в крови даже после приема внутрь 20 мг составляет всего несколько десятков пикограмм на мл крови. К недостаткам этих методов можно отнести следующее: относительно высокую стоимость определения, необходимость специфического оборудования и, главное, далеко не для всех лекарств существуют соответствующие наборы реактивов.

Для исследования концентрации лекарств применяются различные микробиологические методы анализа. В первую очередь такие методы применяются при исследовании ЛВ, обладающих антибактериальной или противогрибковой активностью. Микробиологические методы основаны на способности антибактериальных препаратов вызывать гибель микроорганизмов или задерживать их рост. Обычно используют три микробиологических метода: метод диффузии в агар, метод серийных разведений и турбидиметрический метод. Метод диффузии в агар является наиболее широко применяемым методом для определения антибиотиков. Этот метод основан на сравнении интенсивности подавления роста тест-микроба препаратом в исследуемой биологической жидкости при известной концентрации препарата. В основу метода положена способность ряда антибактериальных препаратов диффундировать в агаровую среду и образовывать зоны, в которых не растут микроорганизмы. Скорость и величина диффузии препаратов в агаровую среду зависит от многих факторов (состав и pH среды, природа исследуемого лекарства, времени и температуры инкубации и др.), в связи с чем для каждого препарата подбирают наиболее оптимальные условия для максимальной диффузии препарата в агаровую среду. Исследование активности антибиотиков проводят в чашках Петри, в которые разливают растопленную на водяной бане агаризированную питательную среду с внесенным в нее тест-микробом. Растворы стандарта вносят с помощью капельницы в полые цилиндры, расставленные на поверхности агаризированной среды, или вырезанные в толще среды лунки. Применяют также диски из фильтровальной бумаги, которые пропитаны раствором препарата и испытуемой жидкости и помещают на

поверхность агара. После 16-18-часовой инкубации при 37°C измеряют зоны задержки роста тест-микроба с помощью циркуля, миллиметровой линейки или с помощью специальных приборов. Метод диффузии в агар отличается простотой выполнения, достаточной чувствительностью. К недостаткам метода можно отнести длительность проведения и сравнительно малую точность определения. Такими же достоинствами и недостатками отличаются и другие микробиологические методы. Так метод серийных разведений наряду с достаточно высокой чувствительностью также имеет большую длительность проведения эксперимента, а, кроме того, наличие в сыворотке веществ, задерживающих рост микроорганизмов, может исказить результаты анализа. Помимо сказанного, подобные методы не позволяют определять концентрацию метаболитов.

Метод хромато-масс-спектрометрии для фармакокинетических исследований является одним из самых избирательных и чувствительных. Однако этот метод является одним из самых дорогих по стоимости оборудования. Данный метод совмещает газовую или жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию, которая используется для детектирования веществ, выходящих из хроматографической колонки. Масс-спектрометрия — это метод исследования веществ, подвергнутых ионизации, с последующим разделением образовавшихся ионов по их массам и регистрацией количества ионов каждой массы. Для ионизации молекул используются различные способы: электронный удар, фотоионизация, химическая ионизация и др. Образовавшиеся из исследуемых молекул ионы разделяются по массам в магнитном поле при сканировании его напряженности. Ионы различной массы регистрируются по отдельности и интенсивность сигнала, соответствующего данной массе, пропорциональна количеству ионов с этой массой. Масс-спектр, таким образом, представляет собой группу полос, каждая из которых соответствует массе каждого из образовавшихся ионов, а высота полосы соответствует количеству ионов данной массы. В современных ГХ/МС — системах можно одновременно детектировать несколько характерных фрагментов анализируемых соединений. Таким образом, масс-фрагментография является высокоизбирательным и высокочувствительным методом анализа — его чувствительность достигает 10^{-12} г вещества в образце, вводимым в систему.

В настоящее время наибольшее распространение получили хроматографические методы определения концентрации ЛП и, безусловно, наиболее применимым в таких исследованиях является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии — ВЭЖХ. Причины этого заложены в высокой чувствительности, селективности и относительной простотой применения, наличия приборов последних поколений, обладающих высокой чувствительностью, полностью автоматизированных, управляемых современными компьютерными программами. Принципы, заложенные в основу

хроматографического анализа в 1903 г. М.С. Цветом практически не претерпели особых изменений. В основе метода лежит различная сорбционная способность каждого химического вещества на том или ином сорбенте (веществе с большой адсорбционной емкостью). Продвигаемая носителем (элюентом) вдоль слоя сорбента смесь веществ из-за разной величины адсорбционных свойств в одних и тех же условиях подвергается разделению (подобно разделению по температурам кипения, которое происходит при перегонке). При этом сорбент может быть в виде тонкого слоя на пластинке, а элюент продвигаться вдоль пластинки за счет капиллярных сил. В этом случае мы имеем дело с тонкослойной хроматографией (ТСХ). Сорбент может быть упакован в достаточно тонкую стеклянную или металлическую трубку (колонку), а анализируемая смесь — продвигаться вдоль колонки потоком инертного газа (газ-носитель) с определенной скоростью и тогда метод будет называться газовой хроматографией. В некоторых случаях колонка представляет из себя очень длинный (до 100 и более метров) капилляр диаметром 0,25 мм изготовленный из стекла или металла, на стенки которого нанесен очень тонкий, почти мономолекулярный слой высококипящей неподвижной фазы. Такие хроматографические колонки обладают очень высокой эффективностью, а метод с их использованием называется капиллярной газовой хроматографией. Если в качестве элюента выбран какой-либо растворитель с малой вязкостью или смесь растворителей, продвигающихся вдоль колонки с помощью насоса высокого давления, тогда метод будет называться методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). После проведения хроматографического разделения необходимо обработать полученные данные, определить, что мы получили в результате анализа и в каком количестве, т.е. провести качественный и количественный анализ. Такой анализ проводится с помощью приборов, называемых детекторами, а запись полученного сигнала осуществляется в виде цифровой или аналоговой форме либо с помощью компьютера, либо самописцев. В конечном результате мы получаем хроматограмму — картину разделения, где каждому разделенному веществу соответствует индивидуальный пик.

За последние два десятилетия опубликовано множество монографий, руководств и статей, посвященных теории и практике этого метода анализа. Это объясняется большими преимуществами метода ВЭЖХ по сравнению с другими методами анализа:

При использовании метода ВЭЖХ отсутствуют ограничения по термоустойчивости анализируемых образцов, присущих таким методам как ГЖХ, ГХ-МС.

Применение данного метода позволяет работать с водными растворами, что существенно сокращает общее время анализа и упрощает процесс подготовки биологических проб.

В большинстве случаев отпадает необходимость

проведения дериватизации анализируемого вещества.

Практически все известные детектирующие системы неdestructивны, что позволяет работать в микро-репаративном режиме, а это особенно важно при изучении метаболизма лекарственных средств.

Хроматографические колонки, применяемые в настоящее время, обладают хорошей эффективностью, не уступающей колонкам, используемым в газовой хроматографии.

Детектирующая аппаратура по чувствительности определения во многих случаях приближается к таким сверхчувствительным приборам, как хромато-масс-спектрометр.

Наибольшее распространение при проведении фармакокинетических исследований получили такие варианты применения ВЭЖХ как обратно-фазная, ион-парная хроматография. Данные варианты ВЭЖХ обладают несомненными преимуществами перед другими классическими вариантами жидкостной хроматографии. К ним относятся большая универсальность метода в отношении очень большого числа ЛВ, возможность анализировать непосредственно водные биологические методы или свести процесс подготовки проб к простому осаждению белков. При применении обратно-фазной ВЭЖХ исследователь получает высокую воспроизводимость метода.

ВЭЖХ — достаточно универсальный метод анализа (практически 80-90% всех применяемых в настоящее время лекарств можно определять с помощью этого метода).

От того, каким методом предстоит воспользоваться, зависит многое, например, способ подготовки биологических проб. Анализ лекарственных препаратов в цельной крови не всегда дает необходимый результат, так как для многих препаратов отмечено накопление их в форменных элементах, а использование суммарной концентрации препарата в крови может дать искаженные в конечном итоге результаты. Известно, что у взрослого человека объем жидкой части крови без форменных элементов (плазмы) составляет примерно 3 л. После отделения фибриногена — белка, ответственного за свертывание крови и некоторых других белков, образующих форменные элементы, остается сыворотка крови, которая отличается от плазмы только отсутствием фибриногена. В сыворотке крови помимо минеральных солей, белков, липидов находится много эндогенных низкомолекулярных соединений, которые могут мешать проведению анализа: гормоны, кортикостероиды, биогенные амины, креатинин, мочевиная кислота и др. Многие лекарства связываются с белками сыворотки крови (например, хинидин — более чем на 90%), однако, следует иметь в виду, что основные фармакокинетические процессы определяются свободной (несвязанной) фракцией препарата в крови. Это особенно важно при проведении анализов, дающих результаты по суммарной концентрации препарата. При подготовке пробы для последующего анализа

очень важно стандартизировать все проводимые операции. Только при соблюдении этого условия можно получить воспроизводимые результаты.

В основном процесс подготовки проб для анализа сводится к следующим процедурам:

Получение сыворотки крови.

Извлечению препарата в удобной для анализа форме (одно- или многократная экстракция препарата с помощью различных экстрагентов, твердофазная экстракция или простое осаждение белков тем или иным реактивом). В последнем случае необходимо помнить, что при осаждении белков сыворотки крови происходит разбавление образца, что влияет на чувствительность выбранного метода анализа.

Сохранение образца в виде сывороточных экстрактов, упаренных образцов после экстракции, надосадочной жидкости или супернатанта после осаждения или просто сыворотки крови.

Следует помнить, что при проведении фармакокинетических исследований некоторые препараты могут довольно быстро подвергаться биотрансформации (окислению, гидролизу и т.п.) Исходя из этого, каждый исследователь определяет минимальные и максимальные сроки проведения анализа, которые указываются в программе исследования. Особенно отмечаются сроки и температура хранения образцов до анализа. В процессе разработки аналитического метода следует рассмотреть и по возможности исключить (или стандартизировать) все возможные варианты потерь вещества при проведении основных и вспомогательных операций, чтобы избежать ошибок в анализе.

Очень часто выбор метода анализа лекарственного препарата зависит от наличия той или иной аппаратуры в распоряжении исследователя. Требования, предъявляемые к выбираемому методу анализа можно сформулировать следующим образом: метод анализа должен быть чувствительным для получения надежных результатов, воспроизводимым, дешевым и достаточно экспрессным. Процесс подготовки проб для анализа не должен занимать много времени и должен быть относительно простым и воспроизводимым. Метод анализа должен обладать большой производительностью, так как в большинстве случаев идет речь о проведении сотен единичных анализов за короткое время. Определившись с вышеперечисленными требованиями, исследователь, исходя из химической структуры, выбирает оптимальный вариант. Например, анализируемое вещество интенсивно поглощает ультрафиолетовый свет на длине волны 272 нм, обладает молекулярным весом от 120 до 350, имеет нейтральную реакцию и водорастворимо. В таком случае вполне подходит вариант обратно-фазной ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором, настроенным на длину волны поглощения 272 нм, с предварительным осаждением белков сыворотки крови метиловым спиртом, взятом в соотношении 3:1 и последующим анализом надосадочной жидкости на обратно-фазной хроматографической колонке при со-

ответственно выбранных условиях хроматографирования. Однако, всегда следует помнить, что стоимость аппаратуры, расходуемых материалов довольно высока (например, стоимость хроматографической колонки может достигать несколько сотен долларов). Поэтому необходимо предусматривать дополнительные защитные меры для продления срока эксплуатации колонок. К таким мерам относятся установка дополнительных металлокерамических фильтров, предколонок, использования в качестве элюентов нейтральных или слабодиссоциирующих растворов (щелочная среда способствует быстрому гидролизу связей химически «пришитых» на поверхность сорбента на подвижных фаз и тем самым — быстрому выходу из строя хроматографической колонки). Подобные защитные меры приводят к некоторому ухудшению качества разделения, снижают эффективность работы колонки, что необходимо учитывать при разработке метода анализа.

Значительно более качественные результаты можно получить при применении различных экстракционных процедур. В некоторых случаях возможно применять твердофазную экстракцию. В настоящее время выпускается довольно большой спектр так называемых экстракционных патронов или картриджей для проведения подобных процедур, которые сводятся в таких случаях к посадке анализируемого раствора на патрон и смыванию активного вещества точным объемом заранее подобранного растворителя. При этом большинство эндогенных веществ, которые могли бы помешать хроматографическому разделению остается на сорбционном слое патрона. Вполне сохраняют свою актуальность и традиционные экстракционные процедуры, сводящиеся к подбору экстрагента, встряхивания на различных типах миксерах, разделению фаз с помощью центрифугирования, отбору аликвоты органического слоя, упариванию досуха в токе инертного газа при относительно невысокой температуре, смыву сухого остатка в ограниченном количестве подходящего растворителя и вводу полученного раствора в хроматографическую колонку. При таком подходе практически исключается попадание в колонку остаточных белков, прочих механических примесей и обеспечивается дополнительная очистка исследуемого препарата. Однако, возникает возможность образования дополнительных потерь анализируемого вещества, трудно поддающихся учету. Существенно сократить потери можно, если применять концентрирующую рекстракцию. При этом содержащееся в экстрагенте вещество прямо без потерь переводится в водную фазу и после разделения фаз непосредственно отбирается микрошприцом и вводится в колонку. Нами подобный метод был разработан при анализе теофиллина. Примерно такие же процедуры подготовки проб проводятся если был избран газ-хроматографический или масс-спектрометрический методы анализа. Единственным отличием здесь является то, что в этих случаях нельзя применять водосодержащие и некоторые другие растворители на пос-

ледней стадии.

Принятые обозначения. При проведении исследований биоэквивалентности обычно употребляются следующие обозначения:

- C — концентрация лекарственного вещества;
- $C_{\max}$ — максимальная концентрация лекарственного вещества;
- $C_{\min}$ — минимальная концентрация лекарственного вещества;
- C_{ss} — концентрация лекарственного вещества при равновесных условиях;
- C_t — концентрация лекарственного вещества в последней пробе;
- $T_{\max}$ — время достижения максимальной концентрации лекарственного вещества;
- t — длительность наблюдения за концентрацией лекарственного вещества;
- $T_{1/2}$ — время полувыведения лекарственного вещества;
- k_{el} — константа скорости элиминации лекарственного вещества;
- τ — интервал дозирования при многократном приеме (введении) лекарственного средства;
- AUC — площадь под кривой «концентрация лекарственного вещества — время»;
- AUC_{0-t} — площадь под кривой «концентрация лекарственного вещества — время» в интервале времени от 0 до времени последнего забора пробы;
- $AUC_{0-\infty}$ — площадь под кривой «концентрация лекарственного вещества — время» в интервале времени от 0 до бесконечности;
- MRT — среднее время удержания препарата в организме;
- T — исследуемый препарат (тест-препарат);
- R — препарат сравнения (референс-препарат);
- f — относительная степень всасывания (относительная биодоступность) лекарственного вещества, определяемая отношением $AUC_{\infty T}/AUC_{\infty R}$ в случае однократного введения препаратов или отношением $AUC_{t,T}/AUC_{t,R}$ в случае многократного введения;
- f — относительная степень всасывания ЛС, определяемая отношением $AUC_{t,T}/AUC_{t,R}$;
- f' — отношение $C_{\max,T}/C_{\max,R}$;
- CV_{res} — внутригрупповой коэффициент вариации;
- σ^2 — внутригрупповая (остаточная) дисперсия.

Оценка биодоступности лекарственного вещества или его основного биологически активного метаболита (если изученные препараты представляют собой пролекарства) основывается на сравнении значений фармакокинетических параметров, полученных в результате анализа кривых «концентрация (C) — время (t)» для исследуемого препарата и препарата сравнения. Значения параметров $C_{\max}$ и $T_{\max}$ обычно оцениваются внесистемными методами (наибольшее из измеренных значений концентрации соответствует $C_{\max}$ и соответствующее время наблюдаемого макси-

му — $T_{\max}$). Величину AUC_{0-t} рассчитывают при помощи метода обычных или логарифмических трапеций. Значения $AUC_{0-\infty}$ определяют по формуле: $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + AUC_{t-\infty}$, при этом $AUC_{t-\infty} = C_t / K_{el}$, где C_t и K_{el} — значения концентрации лекарственного вещества в последней пробе и константы скорости элиминации, соответственно. Для вычисления последней конечный (моноэкспоненциальный) участок фармакокинетической кривой описывают с помощью нелинейного регрессионного анализа или уравнением прямой линии в координатах $\ln C - t$, используя метод линейной регрессии. При достаточной длительности наблюдения, когда $AUC_{0-t} > 80\% AUC_{0-\infty}$, для оценки полноты всасывания исследуемого препарата следует использовать значения AUC_{0-t} , а при условии, что $AUC_{0-t} < 80\% AUC_{0-\infty}$ — значения $AUC_{0-\infty}$. Последующий анализ фармакокинетических данных предусматривает вычисление индивидуальных значений AUC_{0-t} или $AUC_{0-\infty}$ (оценку отношений AUC , оценку средней относительной степени всасывания в процентах $f = AUC_{0-t,T} / AUC_{0-t,R}$ или $AUC_{0-\infty,T} / AUC_{0-\infty,R}$) и индивидуальных значений отношений $C_{\max}$, оценку среднего отношения $f^* = C_{\max,T} / C_{\max,R}$. Биоэквивалентность проверяется по AUC_{0-t} или $AUC_{0-\infty}$, а также $C_{\max}$ — для любых лекарственных форм, параметрам $C_{\max} / AUC_{0-t}$ или $C_{\max} / AUC_{0-\infty}$ — для обычных форм, и параметру $(C_{\max} - C_{\min}) / C_{ss}$ — для форм пролонгированного действия (интегральная средняя концентрация $C_{ss} = AUC_{0-\tau} / \tau$, где τ — период наблюдения).

Роль математической статистики. Законы статистики играют большую роль в проведении любых клинических исследований. Особенно эти законы должны соблюдаться при проведении исследований биоэквивалентности лекарств. Это касается буквально любого вышерассмотренного раздела. Так, например, большую роль играет статистика при обосновании количества испытуемых добровольцев. Наш опыт проведения подобных исследований позволяет это утверждать. Несколько лет назад, когда регламент проведения исследований по биоэквивалентности лекарств не был окончательно разработан в нашей стране, мы проводили исследования ципрофлоксацина, производившегося одной зарубежной фирмой. Проведенное на 6 добровольцах исследование показало, что исследуемый препарат по основным фармакокинетическим показателям хорошо согласуется с препаратом сравнения. Однако значительный межиндивидуальный разброс полученных данных не позволил статистически достоверно утверждать, что представленные лекарственные формы биоэквивалентны. Поэтому по решению ФГК нам пришлось провести дополнительное исследование еще на 6 добровольцах.

Более подробно применяемые статистические методы обсуждаются в статье Бондаревой И.Б. «Статистический анализ данных исследований биоэквивалентности лекарственных средств».

Как выглядит окончательный отчет? После окончания исследования составляется окончательный отчет, где должны быть представлены:

- программа проведения испытаний, утвержденная Фармакологическим государственным комитетом;
- демографические и антропометрические (и клинические, если испытания проведены у больных) данные об испытуемых;
- номера серий и названия фирм-изготовителей изученных препаратов — генерического и препарата сравнения, данные о сроке их годности;
- способ введения и дозы препаратов;
- план рандомизации;
- методика отбора биоматериала и его предварительной обработки, условия хранения проб;
- описание аналитического метода, включающее метрологические характеристики и демонстрационные хроматограммы, если использованы хроматографические методы;
- описание процедур фармакокинетического анализа и оценки биоэквивалентности с указанием использованных программных средств;
- результаты определения содержания лекарственного вещества в биопробах, соответствующие средние значения и величины стандартных отклонений;
- индивидуальные фармакокинетические профили и карты добровольцев;
- усредненные фармакокинетические профили;
- индивидуальные значения параметров фармакокинетики, соответствующие средние значения и величины стандартных отклонений;
- результаты дисперсионного анализа параметров фармакокинетики, используемых для оценки биоэквивалентности;
- при проведении исследования на пациентах, указывается пол, возраст, жалобы, анамнез заболевания, диагноз, характер поражения внутренних органов и их функциональное состояние на момент включения их в группу исследуемых.

Контроль за проведением исследований биоэквивалентности лекарств. При проведении исследований по биоэквивалентности допускается проведение инспектирования данных исследований. Целью инспектирования исследований по биоэквивалентности является защита прав добровольцев и обеспечение качества проводимого исследования в соответствии с утвержденным протоколом. В связи с этим, инспектор осуществляет контроль:

- качества проводимых методов исследования;
- регистрации всех необходимых показателей (в соответствии с протоколом);
- объективного ведения документации;
- за характером, тяжестью и частотой развития побочных эффектов;
- за своевременностью, качеством оказания меди-

цинской помощи, направленной на купирование побочных реакций.

Проведение инспектирования исследования по биоэквивалентности осуществляют эксперты комиссии по клинической фармакологии НЦ ЭГКЛС МЗ РФ. При выявлении серьезных нарушений Инспектор имеет право поставить вопрос перед ФГК МЗ РФ о приостановлении или прекращении действия выданной лицензии на проведение исследований по биоэквивалентности. Справедливости ради надо отметить, что в случае если на заседание комиссии предоставляются неполные или недостоверные данные о проведении исследований биоэквивалентности, проведенные не только у нас, но и в другой стране, комиссия вправе поставить вопрос о проведении повторных исследований.

Результаты оценки биоэквивалентности препаратов рассматриваются экспертами Комиссии по клинической фармакологии НЦ ЭГКЛС МЗ РФ. Соответствующее заключение затем выносится на согласование ФГК МЗ РФ и утверждается в Департаменте МЗ РФ.

Заключение. Итак, исследования биоэквивалентности очередного дженерика проведены. Отчет о проведенном испытании успешно прошел все необходимые формальности. Лекарство оказалось на прилавках аптек. Фирма-производитель своевременно провела рекламную кампанию, большое количество ознакомительных семинаров, на которых выступили известные специалисты. Что же дальше? Врачи и фармацевты не только в регионах, но и работающие в столичных по-

ликлиниках и аптеках по-прежнему не имеет никакой документированной информации о предлагаемых препаратах. Было бы очень хорошо, если бы в нашем отечестве выпускалась соответствующая справочная литература, в которой бы описывались если не все результаты проведенного исследования, то хотя бы основные фармакокинетические параметры предлагаемого лекарственного средства, как это делается во многих развитых странах. Причем совсем было бы хорошо, если бы эти данные давались в сравнении с аналогичными данными уже известных препаратов. Тогда бы каждый врач выписывал бы тот или иной препарат основываясь на фармакокинетическом и фармакоэкономическом подходе. Кроме этого вполне возможно, что в этом случае не было бы необходимости регистрировать подряд десятки препаратов с почти одинаковыми свойствами, а достаточно было бы ограничиться тремя лучшими по фармакокинетическим и фармакоэкономическим параметрам лекарствами. Конкурентная борьба между фирмами, выпускающими дженерики увеличилась бы, а значит выиграл бы наш отечественный потребитель. Поскольку таких изданий в настоящее время не выпускается и в ближайшем обозримом будущем не предвидится, то при появлении представителя фирмы, выпускающей дженерик, фармацевт или врач должен и обязан проверить соответствуют ли предлагаемые к реализации препараты действующему в России законодательству, прошел ли данный препарат регистрацию в ФГК, проводились ли соответствующие испытания и есть ли в наличии отчетная документация по этим испытаниям.

Статистический анализ данных исследований биоэквивалентности

И.Б. Бондарева

НИИ физико-химической медицины МЗ РФ, г. Москва

Появление большого количества генерических лекарственных препаратов объясняет все возрастающий интерес к проблеме биоэквивалентности, планированию и статистическому анализу данных исследований, проводимых для установления биоэквивалентности. Установление биоэквивалентности (фармакокинетической эквивалентности) препаратов (обычно генерического и оригинального), предназначенных для внесосудистого введения и действие которых опосредовано появлением лекарственного средства в системном кровотоке, предполагает выполнение специального фармакокинетического исследования для сравнения относительной биодоступности лекарственного вещества при введении в одинаковых дозах при одинаковых условиях. Биодоступность характеризуется степенью всасывания (количеством препарата, достигающим системного кровотока) и скоростью процесса всасывания. Обычно такие исследования проводятся в соответствии с двойным слепым перекрестным дизайном. В качестве стандарта для сравнения обычно берется известный зарегистрированный препарат, а в качестве тестового — изучаемый препарат со сходными свойствами.

Базовая методология при таких исследованиях основывается на предположении, что идентичность (или достаточная близость) в смысле создаваемого фармакологического эффекта фармакокинетических кривых изменения концентрации препарата в крови от времени для тестового препарата и стандарта означает их терапевтическую эквивалентность. То есть, основная идея, лежащая в основе исследований биоэквивалентности, может быть сформулирована следующим образом. Пусть I — процесс абсорбции дозы препарата (D). Часть введенной дозы A , достигающая кровотока, распределяется в организме в соответствии с фармакокинетикой препарата (PK_s). При этом в крови создается определенный профиль концентрации препарата (C), который может быть непосредственно измерен. Препарат также достигает места действия, а создаваемая концентрация C_e приводит к определенному фармакологическому эффекту (R) в соответствии с фармакодинамикой препарата (PD). Схематично этот процесс может быть представлен в виде цепочки, отражающей течение процесса во времени, а в основном причинно-следственные связи (рис.1). Эквивалентность рассматривается последовательно по всем этапам. Основной интерес, безусловно, представляет идентичность уровней создаваемого в результате эффекта R . Предполагается, что при определенных условиях «неэквивалентность» сравниваемых препаратов отражается на процессе их всасывания (I) в большей степени, чем на всех остальных процессах. Однако переменная A не может быть непосредственно измерена, возможны измерения только переменной C , кроме того, кровь в данном

случае рассматривается, как «ворота», через которые должен пройти препарат, чтобы достичь места действия [34].



Рисунок 1. Схематичное представление соотношения между получаемой дозой препарата D и создаваемым фармакологическим эффектом R .

Для количественного сравнения процесса абсорбции препаратов (I) необходимо выбрать показатели, характеризующие его в полной мере. Основным показателем для сравнения степени всасывания считается так называемое отношение биодоступности — отношение площадей под фармакокинетическими кривыми для тестового препарата и стандарта (в предположении равенства значений клиренса сравниваемых препаратов у индивидуального субъекта). Достаточно сложной задачей оказалось найти точный способ практической оценки и сравнения скоростей всасывания лекарственного препарата, этот вопрос обсуждается в [2,11,14,26,37,39,41].

Проведение исследований биоэквивалентности и статистический анализ результатов таких исследований регламентируется специально разработанными правилами [1,21]. Хотя в этой работе анализ основных показателей и статистических процедур, применяемых в исследованиях биоэквивалентности, проведен в основном на

основе методические рекомендации, разработанных в США [21], приведенные положения полностью соответствуют правилам, действующим в России [1].

Стандартная процедура исследования биоэквивалентности

Обычно клинические исследования, целью которых является установление биоэквивалентности, проводятся в соответствии с двойным слепым АВ/ВА перекрестным дизайном.

Стандартная процедура представляет собой измерение уровней концентрации сравниваемых препаратов и метаболитов в крови (иногда еще и в моче) после получения однократной дозы или при повторяющемся дозировании для каждого субъекта, включенного в исследование. Периоды измерения концентрации для различных препаратов у одного и того же субъекта разделяются достаточно продолжительным временным интервалом (5-6 периодов полувыведения препарата), необходимым для исключения взаимовлияния препаратов. Измерения концентраций при однократном приеме препарата производятся в течение, по меньшей мере, трех – четырех периодов полувыведения препарата или прекращаются после снижения концентрации ниже пределов регистрации.

Основные показатели биоэквивалентности

Согласно действующим правилам [21], биоэквивалентность проверяется с помощью некомпартментного подхода. Показатели биоэквивалентности оцениваются или рассчитываются непосредственно по зарегистрированным фармакокинетическим кривым. Правила регламентируют выбор основных показателей эквивалентности, которые оцениваются непосредственно по зарегистрированным кривым концентрация – время. Минимальный набор основных параметров сравнения при однократном приеме препаратов включает средние значения (или медианы) следующих фармакокинетических показателей [21]:

- AUC_{0-T} – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время от нулевого момента времени до времени T последнего измерения, вычисленная методом трапеций;
- $AUC_{0-\infty}$ – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время от нулевого момента времени до бесконечности, $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-T} + C_T/\lambda$, где C_T – значение последней измеренной концентрации, λ – константа скорости элиминации препарата, вычисленная подходящим методом (например, методом наименьших квадратов по последним измерениям концентрации, соответствующих нисходящей фазе ФК профиля);
- Значение максимальной концентрации C_{max} и значение времени достижения максимальной

концентрации T_{max} , оцененные без интерполяции по зарегистрированным кривым.

Отношение биодоступности (отношение площадей под фармакокинетическими кривыми для тестового препарата и стандарта) является оценкой относительной степени всасывания. Параметры C_{max} и T_{max} , несмотря на многочисленные научные споры, используются для количественного сравнения скорости всасывания. Показатель C_{max}/AUC также часто включается для оценки скорости всасывания [8,30,31]. Для косвенной оценки скорости всасывания может использоваться и показатель MRT – среднее резидентное время (вместе с его дисперсией – показателем VRT). Показатели MRT и VRT рассчитываются с помощью метода моментов по зарегистрированным кривым концентрация – время (соответствующие формулы приведены, например в [2,3]).

В случае многократного дозирования и исследования биоэквивалентности при стационарном распределении препарата в организме рекомендуемый минимальный набор показателей включает [21]:

- $AUC_{0-\tau}$ – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время от нулевого момента времени до конца интервала дозирования τ , вычисленная после установления стационарного распределения;
- Значение максимальной концентрации C_{max} и значение времени достижения максимальной концентрации T_{max} , оцененные без интерполяции по зарегистрированным кривым после приема последней дозы препарата;
- C_{min} – концентрация препарата в конце каждого интервала дозирования после установления стационарного распределения препарата;
- C_{av} – средняя концентрация в интервале дозирования после установления стационарного распределения препарата, $C_{av} = AUC_{0-\tau}/\tau$;
- $DF = 100\% \cdot (C_{max} - C_{min})/C_{av}$ – степень колебаний концентрации препарата в интервале дозирования после установления стационарного распределения.

Необходимость изучения биоэквивалентности в стационарном состоянии должна быть обоснована в протоколе исследования.

В исследованиях биоэквивалентности препаратов с контролируемым высвобождением в качестве показателей скорости всасывания могут использоваться также показатели $T_{aboveCav}$ (время превышения средней концентрации) и $T_{75\%C_{max}}$ – время плато концентрации (время превышения 75% от максимальной концентрации), которые оцениваются по зарегистрированным ФК профилям. Показатель $T_{aboveCav}$ предпочтителен для исследований с многократным приемом препарата. В исследованиях с многократным приемом

препарата для оценки величины колебаний концентрации препарата в интервале дозирования также может быть полезен показатель $\% \text{swing} = 100\% \cdot (C_{\max} - C_{\min}) / C_{\min}$ [31].

Основные статистические процедуры и критерии эквивалентности

До начала 80-х годов наиболее распространенным статистическим тестом для проверки биоэквивалентности и сравнения средних значений выбранных показателей был дисперсионный анализ (ANOVA) [15,19,33]. В рамках этого метода выдвигалась стандартная нулевая гипотеза H_0 об отсутствии различий между сравниваемыми препаратами (или, другими словами между выбранными показателями биоэквивалентности). Аддитивная модель, подразумевающая аддитивность вкладов различных составляющих, предполагает, что изучаемый показатель (X_{ijk} — индивидуальное наблюдение переменной y у j — субъекта после получения i — препарата в k последовательности) может быть представлен в виде суммы общего среднего (μ); параметра (σ_j), отражающего специфическую для данного j — субъекта реакцию; параметра τ_i , отражающего эффект от приема именно i — препарата; параметра π_l , характеризующего вклад, связанный с l — периодом измерений; и ϵ_{ijk} — случайной ошибки модели ($k=1,2$; $j=1,\dots,n/2$; $i=1$ и 2). Предполагается, что ошибка ϵ_{ijk} имеет нормальное распределение с нулевым математическим ожиданием и дисперсией De .

В рамках такой модели среднее значение показателя для i — препарата может быть выражено как

$$\bar{X}_i = \mu + \tau_i + \bar{\epsilon}_i,$$

ошибка $\bar{\epsilon}_i$ имеет нормальное распределение с нулевым средним и дисперсией, равной De/n .

Кроме того, основными предположениями, лежащими в основе математической модели данных для метода анализа вариаций в исследованиях биоэквивалентности, являются нормальное распределение данных, рандомизация пациентов, близость значений дисперсии показателей для сравниваемых препаратов.

С помощью F-теста на определенном уровне значимости с учетом числа степеней свободы может быть проверена гипотеза о несущественном вкладе различий между препаратами в общую вариацию данных. Однако такой подход имеет ряд недостатков. Один из них связан с ключевым предположением, на котором основан данный подход. Подход может применяться только в предположении о полном отсутствии взаимовлияния рассматриваемых препаратов в интервалах времени проведения соответствующих измерений. В случае, если период времени между приемом различных препаратов оказался недостаточным для полного исключения такого эффекта, данное предположение нарушается, и результаты оказываются неверными. Если отказаться от этого предположения, необходи-

мые математические модификации модели оказываются слишком сложными [27,39]. Другая проблема обусловлена связью числа испытуемых, устанавливаемой величиной различий и мощности теста. При достаточно большом объеме выборки можно статистически доказать наличие даже очень незначительных с клинической точки зрения различий. С другой стороны, наоборот, слишком маленький объем выборки может не позволить установить даже существенные различия. Попыткой регулировать последнее ограничение можно считать разработку так называемого «80/20» правила [16,27,37]. Оно означает, что исследование биоэквивалентности должно быть спланировано и проведено так, чтобы мощность статистического теста для выявления 20% статистически значимого различия между препаратами была не меньше 80%.

В случае сравнения двух препаратов F-тест для анализа вариаций эквивалентен проверке традиционной нулевой гипотезы об отсутствии различий между средними значениями параметров биоэквивалентности μ_T и μ_R ($\bar{X}_T$ и $\bar{X}_R$ — их выборочные оценки, полученные на основе имеющихся данных) с помощью двустороннего критерия Стьюдента (обычно на уровне значимости 5%). Значение тестовой статистики в этом случае равно

$$t = \frac{\bar{X}_T - \bar{X}_R}{\sigma \sqrt{2/n}},$$

где n — число субъектов, включенных в исследование, σ — среднее квадратичное отклонение, оцененное с помощью анализа вариации для перекрестного дизайна (обычно оценка значения σ — квадратный корень из среднего квадрата «ошибки», или остаточной внутрииндивидуальной вариацией MSE). Вычисленное значение статистики сравнивается с табличным для двустороннего критерия на выбранном уровне значимости. Однако данный тест, как и дисперсионный анализ, устанавливает лишь наличие или отсутствие различий. Таким образом, независимо от мощности теста этот тест по своей сути является средством для проверки гипотезы о точном совпадении средних значений (и соответствующих препаратов), он не позволяет адекватно проверять гипотезу о «приблизительной эквивалентности». Поэтому в настоящее время такой подход применяется не для принятия окончательного решения о биоэквивалентности, а для проверки гипотез о статистической значимости влияния различных факторов: различий между препаратами (терапия), межличностных различий (субъекты), последовательности приема препаратов и периодов исследования на наблюдаемую вариацию данных. Кроме того, полученная с помощью метода ANOVA оценка остаточной вариации (MSE) используется при планировании необходимого числа включаемых в исследование пациентов и расчета соответствующего доверительного интервала.

Для обычного рандомизированного перекрестного дизайна AB/BA статистическая модель дисперсионно-

го анализа должна включать следующие факторы, вносящие вклад в общую наблюдаемую вариацию данных:

- различия между препаратами,
- межиндивидуальные различия,
- последовательность приема препаратов,
- периоды исследования.

Анализ вариаций и критерий Стьюдента являются параметрическими методами и предполагают нормальное распределение данных. Если распределение данных отличается от нормального, или нарушаются любые другие приведенные выше предположения, лежащие в основе метода ANOVA, можно попробовать применить преобразование, приводящее к нормальному распределению, или использовать подходящие непараметрические процедуры сравнения. В случае исследований биоэквивалентности обычно применяют преобразование типа «взятие логарифма» (натурального $\ln$ или десятичного $\lg$). Многие биологические признаки не могут принимать отрицательные значения и имеют несимметричное распределение, что свидетельствует в пользу их лог-нормального распределения. Но, что самое главное, результаты, полученные после такого преобразования, могут быть интерпретированы как геометрические средние. В исследованиях биоэквивалентности отношения средних показателей часто представляют больших интерес, чем различия между ними. Использование логарифмического преобразования позволяет перейти от различий между средними значениями преобразованных данных в соответствии с аддитивной моделью (для которой применимы хорошо разработанные статистические процедуры) к отношению соответствующих средних значений (или медиан) исходных данных.

Если предполагается лог-нормальное распределение соответствующего параметра, сравнение его средних значений с помощью дисперсионного анализа проводится на основе мультипликативной модели данных. В этом случае X_{ijk} — индивидуальное наблюдение показателя сравнения y_j — субъекта после получения i -препарата в k последовательности ($k=1,2$; $j=1,\dots,n/2$; $i=1,2$, $l=1,2$) представляет собой произведение общего среднего (μ); параметра s_{jk} , отражающего случайный эффект, специфический для данного j -субъекта при получении терапии в k -последовательности; параметра t_i , отражающего прямой эффект от приема именно i — препарата; параметра π_l , характеризующего влияние l -периода измерений; и случайной ошибки модели (ϵ_{ijk}). Обычно $\ln s_{jk}$ имеет нормальное распределение с нулевым математическим ожиданием и D_s , а $\ln \epsilon_{ijk}$ — нормальное распределение с нулевым математическим ожиданием и D_ϵ .

Взятие логарифма от обеих частей модели приводит к соотношению:

$$Y_{ijk} = \ln X_{ijk} = \ln \mu + \ln t_i + \ln s_{jk} + \ln \pi_l + \ln \epsilon_{ijk}$$

Приведем конечный результат, имеющий приклад-

ное значение: разность средних значений $\bar{Y}_2$ и $\bar{Y}_1$ трансформированных переменных (при логарифмическом преобразовании данных) для сравниваемых препаратов, является несмещенной оценкой логарифма отношения средних значений исходных переменных $\bar{X}_2$ и $\bar{X}_1$, который в свою очередь оценивает логарифм отношения соответствующих прямых эффектов от сравниваемых препаратов τ_2 и τ_1 :

$$\bar{Y}_2 - \bar{Y}_1 = \ln \frac{\bar{X}_2}{\bar{X}_1} = \ln \frac{\tau_2}{\tau_1}.$$

Тогда легко выводится соотношение, связывающее коэффициент вариации для значений X_{ijk} (CV_X) с остаточной вариацией для Y_{ijk} , предоставляемой, например дисперсионным анализом после логарифмического преобразования данных:

$$D_s + D_\epsilon = D(Y_{ijk}) = \ln\{1 + (CV_X)^2\}$$

Если значение $(CV_X)^2$ мало, $\ln\{1 + (CV_X)^2\} \approx (CV_X)^2$.

А значит, стандартное отклонение трансформированных данных приблизительно равно коэффициенту вариации исходных данных. Последнее соотношение часто применяется для расчета таблиц необходимого числа испытуемых для исследований биоэквивалентности [6,7,18,26]. Надо иметь в виду, что коэффициент вариации исходных данных также относится в данном случае не к полной, а скорее к остаточной вариации данных.

Важность проведения расчетов необходимого числа включенных пациентов подчеркивается в правилах проведения исследований. Обычно эти оценки проводятся отдельно для выбранных показателей эквивалентности.

Объяснение применению логарифмического преобразования данных можно найти и с фармакокинетической точки зрения. Известное общее соотношение, связывающее основные фармакокинетические параметры в рамках линейной кинетики и при условии, что выведение препарата происходит только из центральной камеры, записывается как:

$$AUC_{0-\infty} = \frac{F \cdot D}{CL} = \frac{F \cdot D}{V \cdot k_{el}},$$

$F \cdot D$ — фракция дозы, достигшая кровотока, CL — клиренс препарата у данного субъекта, V — кажущийся объем распределения, k_{el} — константа скорости элиминации.

Таким образом, использование показателя AUC в качестве меры количества препарата, достигшего кровотока, (степень всасывания) предполагает включение в модель мультипликативного члена CL (произведение V и k_{el}), который может рассматриваться как функция от конкретного субъекта. А значит, межиндивидуальные различия не могут адекватно рассматриваться в рамках аддитивной модели исходных данных. Прове-

дение логарифмического преобразования приводит к аддитивной модели:

$$\ln AUC_{0-x} = \ln F + \ln D - \ln V - \ln k_{el}$$

Похожие аргументы справедливы и для показателя C_{max} . В рамках однокамерной модели можно записать следующее уравнение для этого показателя биоэквивалентности:

$$C_{max} = \frac{F \cdot D}{V} \exp\{-k_{el} \cdot T_{max}\},$$

где опять параметры F , D и V представлены в виде мультипликативного члена. После логарифмического преобразования последнее уравнение будет иметь вид, соответствующий аддитивной модели:

$$\ln C_{max} = \ln F + \ln D - \ln V - \ln k_{el} \cdot T_{max}$$

Надо иметь в виду, что для проведения формальной проверки соответствия распределения определенного показателя нормальному или лог-нормальному закону в случае исследования биоэквивалентности обычно не хватает данных (при $n=20, 30$). Поэтому, если не возникает явного противоречия с данными, анализ проводят в предположении о лог-нормальном распределении параметра AUC и C_{max} . Отказ от проведения логарифмического преобразования для этих показателей должен быть обоснован в протоколе исследования. Вообще, в соответствии с правилами, протокол исследования должен отражать предположения о форме распределения выбранных показателей эквивалентности, а также включать их индивидуальные значения, попарные индивидуальные различия (или отношения), средние значения (арифметические и геометрические), средние значения различий (или отношений), соответствующие стандартные отклонения и коэффициенты вариации. Желательно также представлять гистограммы распределения различий и логарифмических отношений основных показателей биоэквивалентности (AUC , C_{max}) [21].

Согласно правилам, статистическая проверка биоэквивалентности состоит в статистическом сравнении средних значений параметров, выбранных в качестве показателей биоэквивалентности (например, AUC и C_{max}), с помощью интервального критерия. Если два таких средних значения оказываются «достаточно близкими» (не обязательно равными), препараты считаются биоэквивалентными.

Авторы [16] пришли к выводу, что для целей исследований биоэквивалентности более корректной формальной формулировкой эквивалентности, с точки зрения статистики, является не традиционная нулевая гипотеза об отсутствии различий, а соответствующая ей альтернативная гипотеза. Таким образом, в случае исследований биоэквивалентности нулевая гипотеза состоит в том, что сравниваемые препараты не эквивалентны, тогда соответствующая ей альтернативная ги-

потеза состоит в том, что препараты эквивалентны. Это позволило связать известные в статистике ошибки первого и второго рода при тестировании статистических гипотез с существующими ошибками или, другими словами, рисками, возникающими в области анализа биоэквивалентности. При проведении подобного анализа существует два типа ошибок или рисков, которые нужно принимать во внимание и, по мере возможностей, стараться снизить. Первая ошибка (соответствует α – вероятности ошибки первого рода) – так называемый «риск потребителя», который заключается в том, что в результате тестирования существует вероятность признания неэквивалентных препаратов биоэквивалентными. Второй тип ошибки риска – так называемый «риск производителя», который заключается в наличии ненулевой вероятности не признать в результате тестирования биоэквивалентные препараты таковыми. Обычно организации, регламентирующие исследование биоэквивалентности, стараются снизить риск потребителя и предоставляют возможность фармацевтической компании решать, какая величина риска производителя является для нее приемлемой. Влиять на величину риска производителя можно с помощью выбора подходящего числа испытуемых (объема выборки). Вопросы определения необходимого числа испытуемых для проведения исследований биоэквивалентности помощью различных статистических тестов рассмотрены в работах [3, 6, 7, 10, 18].

Пусть μ_T и μ_R – генеральные средние показатели биоэквивалентности для тестового и стандартного препаратов. Гипотеза о биоэквивалентности может быть сформулирована в терминах отношения сравниваемых параметров или в терминах их абсолютных различий. Для параметров AUC и C_{max} обычно принято сравнение отношений. Если Q_1 и Q_2 – нижняя и верхняя принятые допустимые границы биоэквивалентности, нулевая гипотеза об отсутствии эквивалентности может быть записана как:

$$H_0: \mu_T/\mu_R < Q_1 \text{ или } \mu_T/\mu_R > Q_2,$$

а соответствующая альтернативная гипотеза о наличии биоэквивалентности формулируется как:

$$H_A: Q_1 \leq \mu_T/\mu_R \leq Q_2.$$

В случае проведения логарифмического преобразования формулировка гипотез также трансформируется:

$$H_A: \delta_1 \leq \mu_T - \mu_R \leq \delta_2,$$

где $\delta_i = \ln(Q_i)$, при $i=1, 2$; в этом случае $\mu_T - \mu_R$ – разность средних значений показателя биоэквивалентности, соответствующая логарифмической трансформации. Такой же вид гипотезы соответствует тестированию абсолютных различий.

Для отношений биоэквивалентности были выбра-

ны допустимые пределы. Если рассматривается абсолютная арифметическая разница между средними, соответствующими допустимыми пределами различий считаются 20% от значения параметра μ_R (0,8 – 1,2). Эти пределы, однако, не являются инвариантными к обратному преобразованию, поскольку величина, обратная 0,8, равна 1,25. А это значит, что, несмотря на кажущуюся симметрию этих пределов, вывод об эквивалентности двух препаратов зависит от того, какой препарат считается тестовым, а какой стандартным. Кроме того, часто анализируются не сами AUC, а их натуральные логарифмы $\ln AUC$. Тогда значениям пределов 0,8 – 1,2 будут соответствовать также несимметричные пределы –0,223 и 0,183. Поэтому в настоящее время приняты значения пределов 0,8 – 1,25 для отношений показателей [21].

Процедура тестирования интервальных гипотез типа H_A или H'_A производится с помощью их декомпозиции и проверки двух соответствующих односторонних тестов для выбранных пределов эквивалентности δ_1 и δ_2 :

$$\begin{aligned} H'_{01} : \mu_T - \mu_R < \delta_1 & \quad H'_{A1} : \mu_T - \mu_R \geq \delta_1 \\ \text{и} & \\ H'_{02} : \mu_T - \mu_R > \delta_2 & \quad H'_{A2} : \mu_T - \mu_R \leq \delta_2. \end{aligned}$$

Вывод об эквивалентности в результате тестирования гипотез может быть сделан, если на одном и том же уровне значимости удастся отвергнуть обе нулевые гипотезы H'_{01} и H'_{02} , а значит, и общую интервальную гипотезу H_0 . Каждая составляющая данной гипотезы проверяется по стандартной процедуре тестирования простой односторонней гипотезы на одном и том же выбранном уровне значимости α . Например, в случае нормального распределения, по критерию Стьюдента рассчитываются тестовые статистики вида [32]:

$$t_1 = \frac{(\bar{X}_T - \bar{X}_R) - \delta_1}{\sigma\sqrt{2/n}} \quad \text{и} \quad t_2 = \frac{\delta_2 - (\bar{X}_T - \bar{X}_R)}{\sigma\sqrt{2/n}}$$

где σ^2 – средний квадрат «ошибки» MSE, предоставляемый анализом вариации. Рассчитанные значения статистик сравниваются с табличным для одностороннего теста и уровня значимости обычно равного 5%.

В исследованиях биоэквивалентности процедура проверки двух таких односторонних гипотез приводит к установлению биоэквивалентности в том случае, если $100 \cdot (1 - 2 \cdot \alpha) \%$ доверительный интервал для различий (или отношений) полностью располагается внутри выбранного интервала эквивалентности. Поэтому в настоящее время для проверки биоэквивалентности обычно вычисляются 90% доверительные интервалы и проверяется, находятся ли они внутри выбранных пределов эквивалентности. Это соответствует проверке двух односторонних тестов на уровне значимости 5%. В настоящее время принято к индивидуальным вычис-

ленным показателям AUC_{ij} применять логарифмическое преобразование и весь последующий анализ проводить для этих трансформированных величин. Вычисленные границы 90% доверительного интервала для выборочной средней разности $\ln AUC$ подвергаются преобразованию, обратному взятию натурального логарифма ($\exp\{\ln AUC\}$), полученные значения сравниваются с пределами эквивалентности (0,8; 1,25). Избежать обратного преобразования можно, сравнив полученные значения для границ доверительного интервала с пределами эквивалентности по логарифмической шкале (–0,223; 0,223). Логарифмическое преобразование применяется и для переменной $C_{\max}$. В общем случае для отношений $C_{\max}$ устанавливаются те же допустимые пределы эквивалентности, что и для переменной AUC.

Значения пределов биоэквивалентности обсуждаются и в настоящее время. Так, для отношений $C_{\max}$ были предложены границы (0,7; 1,43) [7,27]. Аргументом в пользу такого расширения допустимых пределов для отношений $C_{\max}$ было замечание, что такой экстремальный параметр, как $C_{\max}$, основанный на единственном измерении, имеет большую вариацию, чем интегральный показатель AUC. Есть предложение также установить для препаратов с узким терапевтическим коридором более жесткие допустимые границы, скажем (0,9; 1,11) для AUC и (0,8; 1,25) для $C_{\max}$ [7]. В любом случае выбор допустимых пределов биоэквивалентности должен быть основан не только на статистических, но и на клинических данных и соображениях, аналогично выбору «клинически значимого различия». При этом авторы [27] не исключают, что для некоторых антибиотиков такие границы могут быть даже односторонними, например (0,8; ∞).

Известно несколько способов построения доверительных интервалов для разности или отношения показателей биоэквивалентности: на основе парного критерия Стьюдента; на основе остаточной вариации, предоставляемой дисперсионным анализом ANOVA для перекрестного дизайна AB/BA; симметричные интервалы, предложенные Westlake; специальные непараметрические процедуры [27, 32, 38, 39, 41, 42].

В случае построения 90%-ного доверительного интервала для разности средних значений ($d = \mu_T - \mu_R$) с помощью дисперсионного анализа ANOVA для сбалансированного (число пациентов в обеих подгруппах A и B одинаково и равно $n/2$) перекрестного дизайна AB/BA границы могут быть вычислены по формуле:

$$d \pm t(n-2; 0,9) \cdot 2 \cdot MSE/n,$$

где n – общее число включенных в исследование субъектов, MSE – средний квадрат ошибки, оцененный с помощью метода ANOVA, $t(n-2; 0,9)$ – коэффициент Стьюдента (определяется по соответствующим таблицам) для числа степеней свободы $n-2$ и двустороннего 10% уровня.

Тогда 90%-ный доверительного интервала для отно-

шений средних значений (μ_T/μ_R) с помощью дисперсионного анализа ANOVA для сбалансированного перекрестного дизайна AB/BA строится по формуле:

$$(\bar{X}_T \pm t(n-2; 0.9) \sqrt{2 \cdot MSE/n}) / \bar{X}_R.$$

Если в выбранной математической модели данных постулируется отсутствие эффекта периода наблюдения, и исследование биоэквивалентности проводится в соответствии с обычным перекрестным дизайном, предыдущие формулы несколько изменяются:

$$\bar{d} \pm t(n-1; 0.9) \cdot S_d / \sqrt{n},$$

$$(\bar{X}_T \pm t(n-1; 0.9) \cdot S_d / \sqrt{n}) / \bar{X}_R,$$

где S_d — стандартное отклонение попарных различий. Таким образом, в данном случае доверительные интервалы базируются на парном критерии Стьюдента.

В случае незначительного влияния периода наблюдения первые два метода будут давать практически совпадающие интервалы. Метод, предложенный Westlake [41, 42], предоставляет доверительный интервал, симметричный относительно точки отсутствия различий. Далее нами будет приведена одна из непараметрических процедур.

Рассмотренные до сих пор статистические методы проверки биоэквивалентности были параметрическими, то есть предполагали нормальное или лог-нормальное распределение сравниваемых параметров. Для решения этой задачи применяются и непараметрические методы. Так, поскольку такая переменная, как T_{max} , по своей природе не может иметь нормальное или лог-нормальное распределение, рекомендуется применять непараметрические методы анализа. Однако для небольшого объема выборок, часто используемых в таких исследованиях (20, 30 испытуемых), традиционные непараметрические методы являются недостаточно эффективными. Обзор непараметрических методов, применяемых в таких исследованиях, приведен в работах [27, 37].

Остановимся подробнее на одном из таких свободных от предположений о распределении методов, используемых при проверке биоэквивалентности. Он представляет собой некоторое обобщение теста знаковых рангов Уилкоксона [38, 39]. Как было сказано выше, для проверки биоэквивалентности строятся доверительные интервалы для отношений биодоступности $AUC(test)/AUC(standard)$ в предположении конкретной формы их распределения. Метод Уилкоксона позволяет построить такие интервалы без учета формы распределения и, кроме того, позволяет построить распределение вероятностей для таких значений отношений биодоступности. Для данной процедуры предполагается, что в результате исследования, выполненного в соответствии с перекрестным планом, было получено n индивидуальных значений отношений биодоступности $g_i = AUC_i(test)/AUC_i(standard)$ ($i = 1, 2, \dots, n$). Для всех по-

лученных значений g_i вычисляются значения геометрических средних $g_{ij} = \sqrt{r_i r_j}$ (для всех значений i меньше или равных j , $j = 1, 2, \dots, n$), всего $n(n+1)/2$ значений g_{ij} . Полученные значения геометрических средних ранжируются от меньшего к большему. Не вдаваясь в математические подробности (они подробно рассмотрены в [37]), можно сказать, что для наиболее распространенного случая $n=18$ искомые границы 95%-ного доверительного интервала задаются 41-ым (нижняя граница) и 131-ым (верхняя граница) значениями ранжированных геометрических средних (для $n=24$ между 82 и 219 средним). Поскольку при наличии биоэквивалентности индивидуальные отношения AUC должны распределяться вокруг 1, а доверительные интервалы для среднего отношения не должны выходить за пределы (0.8, 1.25), построенная гистограмма распределения индивидуальных геометрических средних дает наглядное представление о соответствии имеющихся данных гипотезе о биоэквивалентности. Строго гипотезу о равенстве единице медианного элемента распределения геометрических средних проверяют с помощью критерия знаковых рангов Уилкоксона. Для этого вычисляются отдельно суммы рангов геометрических средних в ранжированном ряду, больших и меньших единичного значения. Меньшую из двух сумм сравнивают с соответствующим табличным значением. Медианой распределения в случае $n=18$ является 86 элемент в ранжированном ряду. Кроме того, визуальный анализ такого распределения может позволить выявить мультимодальность распределения для некоторых лекарственных препаратов. Такое возможно в случае, если среди испытуемых выделяются субъекты, например, с высокой и низкой скоростью метаболизма одного из препаратов.

Резко отличающиеся наблюдения

Последнее обстоятельство, в соответствии с имеющимися правилами, требует специального рассмотрения и отражения в протоколе исследования. Резко отклоняющиеся наблюдения (outliers) в исследовании биоэквивалентности, обычно проводящегося по перекрестной схеме, означают, что у одного или нескольких субъектов значения различий или отношений индивидуальных показателей биодоступности существенно отличаются от значений у основной группы. Это может быть связано либо с недостатками сравниваемого препарата (например, с особенностями его растворимости), либо с наличием малочисленных подпопуляций, у которых относительная биодоступность сравниваемых препаратов значимо отличается от значений, характерных для остальной популяции. Для этой подпопуляции эти препараты являются небиоэквивалентными даже, если они будут признаны биоэквивалентными в среднем. Для проверки таких резко выделяющихся наблюдений разра-

ботаны специальные статистические тесты. В случае одного выделяющегося наблюдения наиболее часто применяется тест, основанный на проверке студентизированного остатка [25]. Тем не менее, резко выделяющиеся наблюдения не могут быть автоматически исключены из анализа только на основании проверки статистического теста. В случае если статистический анализ показал наличие таких наблюдений, необходимо привести в протоколе научное объяснение этого явления и доказательство справедливости исключения данных этих субъектов из последующего анализа.

Программа BIOEQV для проведения статистического анализа данных исследования биоэквивалентности

Разработанная Бондаревой И.Б. программа BIOEQV применялась в течение последних 6 лет для статистической обработки данных исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов. Эта программа позволяет оценивать немодельным способом основные фармакокинетические показатели, выбранные для демонстрации биоэквивалентности, по результатам проведенных измерений концентрации и проводить полный статистический анализ для оценки биоэквивалентности «в среднем». Моменты фармакокинетической кривой (AUC, MRT – среднее резидентное время, VRT – дисперсия среднего резидентного времени) рассчитываются с помощью численного интегрирования методом трапеций, показатели S_{max} и T_{max} фиксируются непосредственно по измеренным значениям. Обо всех полученных таким образом показателях для тестового препарата и стандарта предоставляется полная параметрическая (средние значения, дисперсии, коэффициенты вариации) и непараметрическая (максимальные и минимальные значения, размах, медианы, квартили) статистика. Информация предоставляется также об индивидуальных и средних различиях (или отношениях) показателей. Набор процедур для статистического анализа данных включает: анализ вариаций, построение доверительных интервалов (95 и 90%) параметрическими и непараметрическим способами, построение гистограмм распределения попарных геометрических средних индивидуальных отношений AUC и S_{max} (в предположении их лог-нормального распределения) и критерий Уилкоксона, парный критерий Стьюдента и построение графиков индивидуальных различий.

Правильность работы программы BIOEQV была верифицирована по приведенным в статьях [31, 39] данным исследований и приведенным там же результатам, полученным с помощью другого программного обеспечения. Этот вопрос подробно обсуждался в [3].

Представление результатов статистического анализа в отчете

В соответствии с правилами [21], все измеренные значения концентрации у всех включенных субъектов должны быть представлены в отчете в нетрансформированном виде. Все рассчитанные индивидуальные значения фармакокинетических показателей для всех включенных субъектов должны быть также представлены в отчете нетрансформированными. Средние значения, стандартные отклонения и коэффициенты вариации (параметрическая статистика) для всех выбранных показателей сравнения должны быть продемонстрированы.

Отчет исследования биоэквивалентности должен отражать статистические предположения о форме распределения выбранных показателей эквивалентности, что определяет последующий выбор процедур для проведения статистических сравнений. Для показателей AUC и S_{max} (в случае предположения о лог-нормальном распределении), кроме значений арифметических средних для тестового препарата и стандарта, должны быть показаны геометрические средние значения (антилогарифм от соответствующего арифметического среднего логарифмированных значений) и средние значения после логарифмического преобразования, а также соответствующие стандартные отклонения. Кроме того, независимо от предположения о законах распределения, желательно демонстрировать в отчете также непараметрическую статистику для выбранных показателей биоэквивалентности (медиана, мода, минимальное и максимальное значение, квантили, размах и т.п.).

Для иллюстрации статистических сравнений индивидуальные значения показателей биоэквивалентности для тестового препарата (T) и стандарта (R) должны быть представлены параллельно в виде параллельных столбцов таблицы. Для показателей AUC и S_{max} должны быть показаны не только индивидуальные значения разностей (T-R), но и индивидуальные значения отношений (T/R) и логарифмов таких отношений ($\log T/R$ или $\ln T/R$) для каждого включенного субъекта. Для каждого субъекта исследования в результирующей таблице должна быть указана последовательность получения сравниваемых препаратов. Также желательно представить в отчете гистограммы распределения значений попарных разностей или логарифмов отношений для основных показателей (AUC, S_{max}).

В отчете должны быть продемонстрированы результаты оценок доверительных интервалов, а также предоставлена вся информация о статистических методах, применявшихся для проверки гипотезы о биоэквивалентности сравниваемых препаратов для всех выбранных показателей.

Программа BIOEQV позволяет провести все требуемые статистические расчеты и получить все индивидуальные значения показателей и их статистические параметры, которые необходимы для формирования отчета и заключения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические рекомендации по проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов // МЗ РФ. Москва, 2001.
2. Сердюченко В.И., Бондарева И.Б. «Математическая статистика в клинических исследованиях» // «Гютар Медицина», Москва, 2000.
3. Сердюченко В.И., Джелифф Р., Бондарева И.Б. «Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение» // Москва. Издательство РАМН, 2003.
4. Benet L.Z., Goyan J.E. «Bioequivalence and Narrow Therapeutic Index Drugs» // *Pharmacotherapy* 15(4): 433-440, 1995.
5. Chen M-L., Patnaik R., Hauck W.W., et al. «An Individual Bioequivalence Criterion: Regulatory Consideration» // *Statistics in Medicine* 19(20): 2821-2842, 2000.
6. Diletti E., Hauschke D., Steinijans V.W. «Sample Size Determination for Bioequivalence Assessment by Means of Confidence Intervals» // *Intern J Clin Pharmacol. Ther and Toxicology* 29(1): 1-8, 1991.
7. Diletti E., Hauschke D., Steinijans V.W. «Sample Size Determination: Extended Tables for the Multiplicative Model and Bioequivalence Ranges of 0.9 to 1.11 and 0.7 to 1.43» // *Intern J Clin Pharmacol. Ther and Toxicology* 30(8):287-290, 1992.
8. Endrenyi L., Fritsch S., Yan W. «Cmax/AUC Is a Clearer Measure Than Cmax for Absorption Rates in Investigations of Bioequivalence» // *Intern J Clin Pharmacol. Ther and Toxicology* 29(10): 394-399, 1991.
9. Endrenyi L., Taback N., Tothfalusi L. «Properties of the Estimated Variance Component for Subject by-formulation Interaction in Studies of Individual Bioequivalence» // *Statistics in Medicine* 19(20): 2867-2878, 2000.
10. Esinhart J.D., Chinchilli V.M. «Sample Size Considerations for Assessing Individual Bioequivalence Based on the Method of Tolerance Intervals» // *Intern J Clin Pharmacol. Ther and Toxicology* 32(1): 26-32, 1994.
11. Fluehler H., Hirtz J., Moser H.A. «An Aid to Decision – Making in Bioequivalence Assessment» // *J Pharmacokin Biopharm* 9(2): 235-243, 1981.
12. Gould AL. «Discussion of Individual Bioequivalence by M.-L. Chen» // *J Biopharm Stat* 7(1): 23-29, 1997.
13. Gould AL. «A Practical Approach for Evaluating Population and Individual Bioequivalence» // *Statistics in Medicine* 19(20): 2721-2740, 2000.
14. Grieve A.P. «Evaluation of Bioequivalence Studies» // *Eur J Clin Pharmacol* 40: 201-203, 1991.
15. Grizzle J.E. «The Two-Period Change-Over Design and Its Use in Clinical Trials» // *Biometrics*, June 1965.
16. Hauck W.W., Anderson S. «Types of Bioequivalence and Related Statistical Considerations» // *Intern J Clin Pharmacol. Ther and Toxicology* 30(5): 181-187, 1992.
17. Hauschke D., Steinijans V.W. «The U.S. Draft Guidance Regarding Population and Individual Bioequivalence Approaches: Comments by Research-based Pharmaceutical Companies» // *Statistics in Medicine* 19(20): 2769-2774, 2000.
18. Hauschke D., Steinijans V.W., Diletti E., et al. «Presentation of the Intrasubject Coefficient of Variation for Sample Size Planning in Bioequivalence Studies» // *Intern J Clin Pharmacol. Ther and Toxicology* 32(7): 376 – 378, 1994.
19. Hills M., Armitage P. «The Two-Period Cross-Over Clinical Trial» // *Br J Clin Pharmac* 8: 7-20, 1979.
20. Hsuan FC. «Some Statistical Considerations on the FDA Draft Guidance for Individual Bioequivalence» // *Statistics in Medicine* 19(20): 2879-2884, 2000.
21. In vivo bioequivalence guidances // U.S. Pharmacopeia 24-NF 19, National Formulary, Supplement 1090, 2000.
22. Ju H.L. «On TIER Method for Assessment of Individual Bioequivalence» // *J Biopharm Stat*, 7(1): 63-85, 1997.
23. Liu J.P., Chow S.-C. «A Two One-Sided Tests Procedure for Assessment of Individual Bioequivalence» // *J Biopharm Stat* 7(1): 49-61, 1997. Liu J.P., Weng C.S. «Estimation of Direct formulation Effect under log Normal Distribution in Bioavailability/Bioequivalence Studies» // *Statistics in Medicine* 11: 881-896, 1992.
24. Lund R.E. «Tables for an Approximate Test for Outliers in Linear Models» // *Technometrics*, Vol. 17(4): 473-476, 1975.
25. Mandallaz D., Mau J. «Comparison of Different Methods for Decision-Making in Bioequivalence Assessment» // *Biometrics* 37: 213-222, 1981.
26. Pabst G., Jaeger H. «Review of Methods and Criteria for the Evaluation of Bioequivalence Studies» // *Eur J Clin Pharmacol* 38: 5-10, 1990.
27. Phillips K.F. «Power of the Two One-Sided Tests Procedure in Bioequivalence» // *J pharmacokin Biopharm* 18(2): 137-144, 1990.
28. Rescigno A. «Rate of Absorption» // *Pharmacological Research* 35(1): 5-6, 1997. Rescigno A., Powers J.D. «AUC and Cmax Are Not Sufficient to Prove Bioequivalence» // *Pharmacological Research* 37(2):93-95, 1998.
29. Sauter R., Steinijans V.W., Diletti E., et al. «Presentation of Results from Bioequivalence Studies» // *Internat J Clin Pharmacol. Ther and Toxicol* 30(7): 233-256, 1992.
30. Schairmann D.J. «A Comparison of the Two One-Sided Tests Procedure and Power Approach for Assessing the Equivalence of Average Bioavailability» // *J Pharmacokin Biopharm* 15(6): 687-680, 1987.
31. Selwyn M.R., Dempster A.P., Hall N.R. «A Bayesian Approach to Bioequivalence for 2X2 Changeover Design» // *Biometrics* 37: 11-21, 1981.
32. Senn S. «Statistical Issues in Drug Development» // John Wiley & Sons, 1997.
33. Steinijans V.W., Hauschke D. «International harmonization of Regulatory Requirements» // *Clinical Research and Regulatory Affairs* 10: 203-220, 1993.
34. Steinijans V.W., Hauschke D., Schall R. «International harmonization of Regulatory Requirements for Average Bioequivalence and Current Issue in Individual Bioequivalences» // *Drug Information Journal* 29: 1055-1062, 1995.
35. Steinijans V.W., Hauschke D. «Update on Statistical Analysis of Bioequivalence Studies» // *Intern J Clin Pharmacol. Ther and Toxicology* 28(3): 105-110, 1990.
36. Steinijans V.W., Diletti E. «Generalization of Distribution-Free Confidence Intervals for Bioavailability Ratios» // *Eur J Clin Pharmacol* 28: 85-88, 1985.
37. Steinijans V.W., Diletti E. «Statistical Analysis of Bioavailability Studies: Parametric and Nonparametric Confidence Intervals» // *Eur J Clin Pharmacol* 24: 127-136, 1983.
38. Wellek S. «A Comment on So-Called Individual Criteria of Bioequivalence» // *J Biopharm Stat* 7(1): 17-21, 1997.
39. Westlake W.J. «Response to Bioequivalence Testing: a Need to Rethink» // *Biometrics* 37: 591-593, 1981.
40. Westlake W.J. «Symmetrical Confidence Intervals for Bioequivalence Trials» // *Biometrics*, 32: 741-744, 1976.
41. Yafune A., Ishiguro M. «Bootstrap Approach for Constructing Confidence Intervals for Population Pharmacokinetic Parameters. I: a Use of Bootstrap Standard Errors» // *Statistics in Medicine* 18(5): 581-599, 1999.

Определение азитромицина в плазме крови методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием

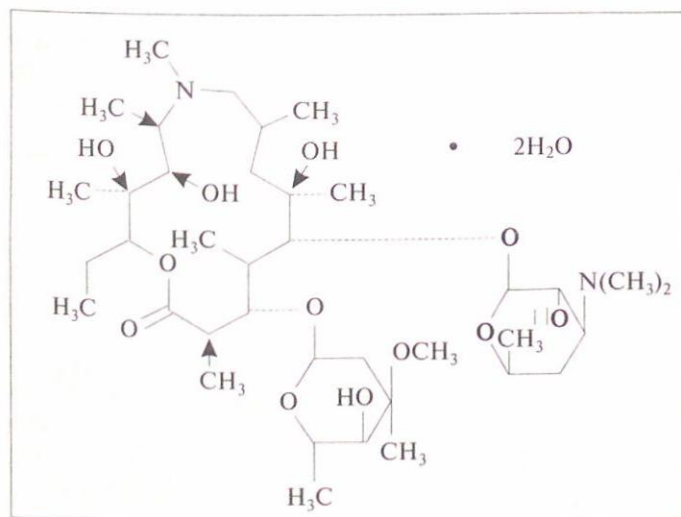
В. В. Писарев¹, Л. Б. Смирнова¹, Н. Е. Москалева¹, Ю. Б. Зверков¹,
В. Г. Белолипецкая², Я. В. Суханов²

¹ — ФГУП «Государственный научный центр по антибиотикам»

² — Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины МЗ РФ

Разработан метод количественного определения азитромицина для ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Предел обнаружения препарата составляет 0,5 нг/мл. Метод был применен для изучения фармакокинетики и биоэквивалентности препарата Азитромицин (капсулы по 250 мг отечественного производства) в сравнении с препаратом Сумамед® (аналогичная лекарственная форма производства компании «Плива», Хорватия). Фармакокинетическое исследование проводилось открытым перекрестным рандомизированным методом. В исследование были включены 18 добровольцев. Были рассчитаны фармакокинетические параметры, необходимые для оценки биоэквивалентности изучаемого препарата. Статистический анализ параметров фармакокинетики показал биоэквивалентность препаратов Азитромицин и Сумамед.

Азитромицин (9-деоксо-9а-аза-9а-метил-9а-гомоэритромицин (А) в виде дигидрата) — антибиотик широкого спектра действия. Наличие в его химической структуре атома азота позволяет отнести этот препарат к новой подгруппе макролидных антибиотиков — аза-лидам. По сравнению с другими макролидами обладает наиболее выраженным бактерицидным эффектом, способностью проникать в ткани, жидкости и клетки организма, максимальной длительностью периода полувыведения.



Азитромицин устойчив в кислой среде, благодаря чему быстро всасывается в желудочно-кишечном тракте (время достижения максимальной концентрации 2–3 ч). Высокий уровень всасывания обеспечивается и липофильностью молекулы азитромицина. После приема внутрь 500 мг препарата биодоступность составляет 37%. Максимальная концентрация в сыворотке после приема этой дозы 0,4 мг/л, однако в тканях и клетках концентрация в 10–50 раз выше, а в очагах инфекции на 24–34% больше, чем в здоровых тканях и коррелирует со степенью воспалительного отека.

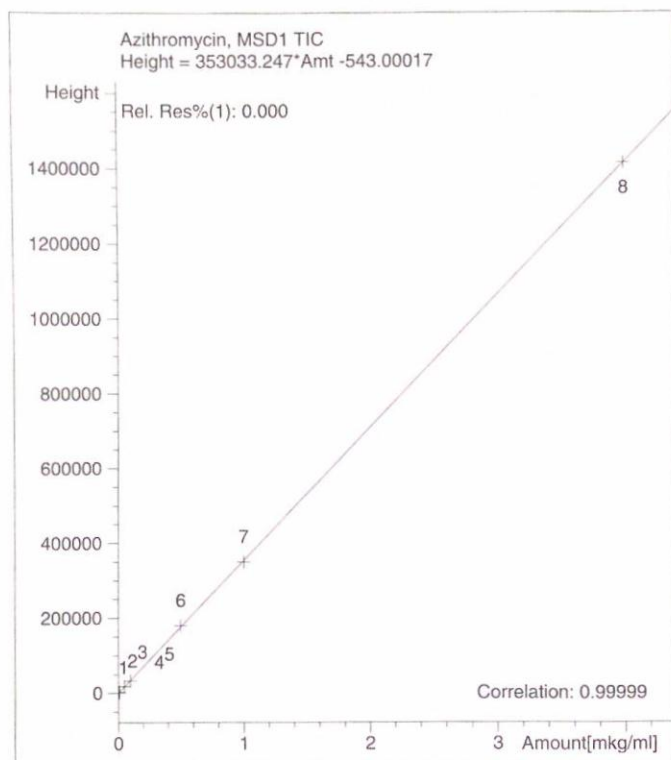
Элиминация азитромицина из сыворотки проходит в два этапа: $T_{1/2}$ составляет 14–20 ч между 8 и 24 ч после приема препарата и 41 ч в интервале от 24 до 72 ч, что позволяет принимать препарат 1 раз в сутки [1].

В литературе имеется несколько публикаций, посвященных количественному определению азитромицина в биологических жидкостях методом ВЭЖХ. Так, в работах [2, 3, 4] анализ проводили методом ВЭЖХ с электрохимическим детектором и чувствительностью обнаружения препарата в плазме крови 10 нг/мл. В докладе [5] описаны условия определения азитромицина методом ВЭЖХ с детектором по флуоресценции. Чувствительность в этом случае составила 98,8 нг/мл. Авторами работы [6] приведены результаты сравнения методов ВЭЖХ с масс-спектрометрическим (химическая ионизация при атмосферном давлении) и электро-

Таблица 1

Калибровочная зависимость полного ионного тока от концентрации азитромицина в плазме крови.

Рис. 1



химическим детектированием, использованных для количественного обнаружения препарата в плазме крови. В этом исследовании удовлетворительная точность и воспроизводимость результатов анализа наблюдалась в диапазоне концентраций 10 – 250 нг/мл и оба метода показали хорошую корреляцию между собой.

Материалы и методы. Анализ проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1100» (США), оснащенным вакуумным дегазатором, градиентным насосом, автосамплером и термостатом колонок, а также масс-спектрометрическим детектором «Agilent 1100VL» (США) с ионизацией при атмосферном давлении в электроспрее (API-ES). При приготовлении пробы использовались вакуумный концентратор DNA mini (Австрия) и картриджи для твердофазной экстракции

Хроматографические характеристики приведенной методики количественного определения азитромицина в плазме крови

Параметр	Значение
Время удерживания, мин	3,5
Коэффициент емкости	1,33
Число теоретических тарелок	4043
Степень извлечения, %	99,2

AccuBond II ODS-C₁₈, 100 мг производства «Agilent» (США).

В работе использовали следующие реактивы: ацетонитрил 1-го сорта («Криохром», Санкт-Петербург), муравьиная кислота (Merck), ацетат аммония и ацетат натрия (Merck).

Хроматографическое разделение осуществляли на колонке Eclipse SB-C₁₈, 5 мкм, 4,6 x 150 мм (США) при температуре 70°C. Элюирование проводили в изократическом режиме. Состав подвижной фазы: ацетонитрил – 0,1 М ацетат аммония – 0,002 М ацетат натрия (60:20:20, об/об). Скорость потока 0,7 мл/мин.

В масс-спектре азитромицина, полученном при ионизации вещества в электроспрее на приборе с одним квадрупольным анализатором, наблюдался интенсивный пик с m/z 749,1, соответствующий протонированному молекулярному иону $[M+H]^+$, и с m/z 771,5 – иону аддукта $[M+Na]^+$. Параметры работы детектора подбирались для достижения максимального выхода аддукта $[M+Na]^+$: фрагментор 200, напряжение капилляра 4500 В, температура газа 350°C, скорость 12,0 л/мин, давление небулайзера 40 psig.

Для выделения азитромицина из плазмы крови и очистки экстракта использовался метод твердофазной экстракции. Картридж предварительно промывали последовательно 1 мл ацетонитрила и 2 мл 10% водного раствора ацетонитрила. К 1 мл плазмы добавляли 0,5 мл ацетонитрила, перемешивали на vortex 2 минуты, центрифугировали 5 минут при 13 000 об/мин. Супернатант переносили в картридж. Картридж промывали 1 мл 10% водного раствора ацетонитрила, затем элюировали азитромицин 4 мл смеси ацетонитрил – 0,01 М ацетат натрия – муравьиная кислота (90 : 10 : 0,1, об/об). Полученный элюат упаривали досуха под вакуумом при температуре 60°C. Пробу растворяли в 200

Метрологические характеристики методики определения азитромицина в плазме крови

Таблица 2

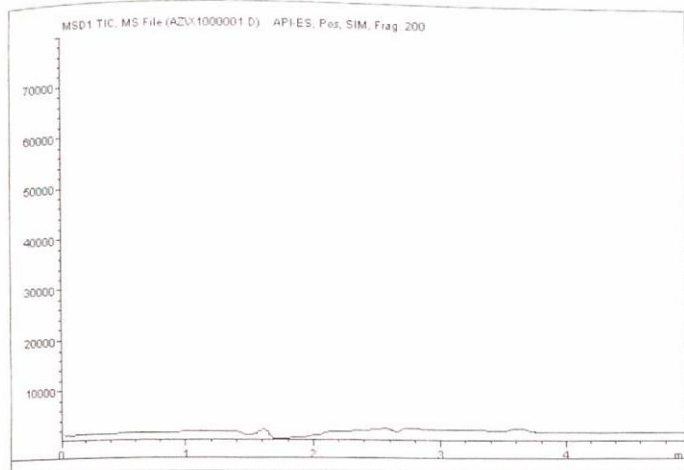
Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	s, мкг/мл	sR	eR
0,01	0,0097±0,0004	0,0004	0,039	0,022
0,1	0,101±0,005	0,0045	0,045	0,01
1	0,98±0,03	0,025	0,025	0,02

Усредненные фармакокинетические параметры азитромицина после однократного приема препаратов в дозе 250 мг

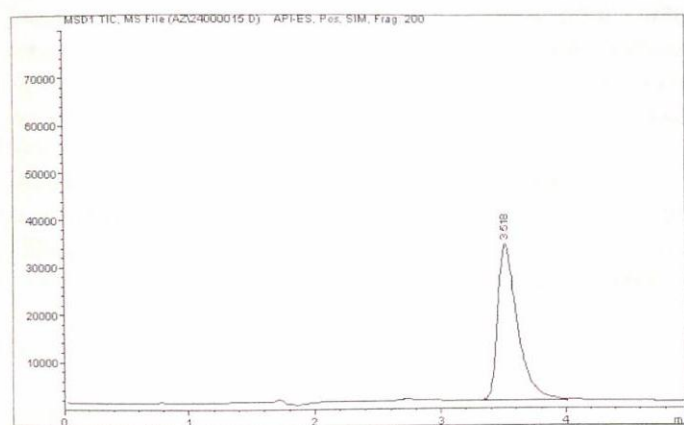
Таблица 3

Препарат	C _{max} , мкг/мл	T _{max} , ч	AUC ₀₋₁ , мкгч/мл	T _{1/2} , ч	C _{max} /AUC ₀₋₁ , ч ⁻¹
АЗИТРОМИЦИН	0,214±0,089	2,50±0,42	1,84	26,09	0,110
СУМАМЕД	0,220±0,105	2,50±0,45	1,94	24,25	0,111

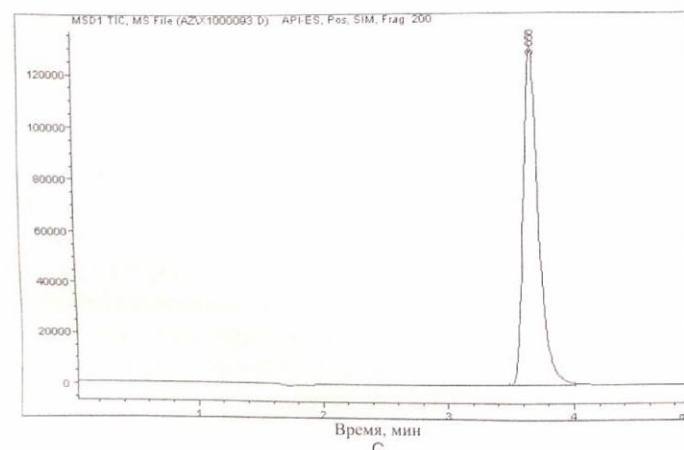
Рис.2
Хроматограмма контрольного образца плазмы крови пациента (А), образца плазмы крови с добавкой азитромицина для создания концентрации 0,1 мкг/мл (В) и хроматограмма плазмы крови пациента через 2 часа после перорального приема исследуемого препарата азитромицина в дозе 250 мг (концентрация азитромицина 0,368 мкг/мл)(С).



Время, мин
А



Время, мин
В

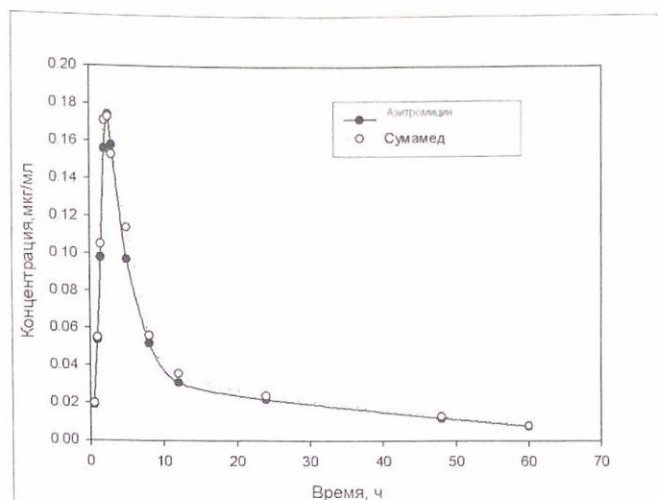


Время, мин
С

мкл метанола и аликвоту 50 мкл переносили в хроматограф. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки с использованием программного обеспечения Chemstation фирмы «Agilent».

Разработанный метод был применен для изучения

Рис.3
Средние фармакокинетические кривые АЗИТРОМИЦИНА и СУМАМЕДА.



фармакокинетики и биоэквивалентности препарата **АЗИТРОМИЦИН** капсулы отечественного производства содержащие 250 мг азитромицина в сравнении с препаратом **СУМАМЕД®**, фирма «Плива» (Хорватия). В исследование были включены 18 добровольцев. Фармакокинетическое исследование проводили открытым перекрестным рандомизированным методом в 2 этапа с интервалом между приемами препаратов 14 дней. Образцы крови в количестве 4 мл отбирали из кубитальной вены через 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 5; 8; 12; 24; 48 и 60 часов после приема препарата. Анализ фармакокинетических данных и оценка биоэквивалентности исследуемых препаратов проведены в соответствии с методическими рекомендациями по проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов [7].

Фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью программы «ESTRIP» модельно-независимым методом. Были рассчитаны следующие параметры: максимальная концентрация C_{max} препаратов в крови (максимальное измеренное значение); время достижения максимальной концентрации T_{max} ; площадь под фармакокинетической кривой AUC_{0-t} ; площадь под фармакокинетической кривой $AUC_{0-\infty}$; период полувыведения $T_{1/2}$; среднее время удержания препаратов в системном кровотоке MRT ; относительная скорость всасывания C_{max}/AUC_{0-t} . Для оценки исследуемого препарата рассчитывали f' — относительную биодоступность исследуемой лекарственной формы азитромицина по отношению к сравниваемой, определяемую отношением $AUC_{0-t,T}/AUC_{0-t,R}$, и f'' — отношение максимальных концентраций $C_{max,T}/C_{max,R}$.

Полученные экспериментальные данные подвергались статистической обработке с помощью программы «Statistica» v 5.0 и EXCEL'97 для персонального компьютера. Рассчитывались следующие статистические параметры: среднее арифметическое значение, среднее

геометрическое значение, стандартное отклонение среднего результата, границы доверительного интервала, проведено парное сравнение фармакокинетических параметров. Оценка биоэквивалентности проводилась применительно к параметрам AUC_{0-1} , C_{max} и C_{max}/AUC_{0-1} (натуральные и $\ln$ -преобразованные данные).

Результаты и обсуждение. Хроматографические характеристики приведенной методики количественного определения азитромицина в плазме крови приведены в табл. 1.

Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки с использованием программного обеспечения ChemStation фирмы «Agilent». Калибровочную кривую получали в результате анализа проб сыворотки с добавками известных количеств азитромицина. Калибровочная зависимость носила линейный характер в диапазоне концентраций 0,001 – 5 мкг/мл (рис. 1). График описывался линейным уравнением $Y=mx+b$, где $m=353033,27$, $b=-543,00$. Коэффициент корреляции 0,99999. Предел обнаружения 0,5 нг/мл.

В табл. 2 приведены метрологические характеристики методики количественного определения азитромицина в плазме крови по результатам 6 параллельных измерений концентрации в образцах плазмы с добавками известных количеств анализируемых веществ.

На рис. 2 представлены хроматограммы контрольной плазмы (А), плазмы содержащей 0,1 мкг/мл азитромицина (В), плазмы крови пациента через 2 часа после перорального приема препарата **АЗИТРОМИЦИН** отечественного производства (С).

На рис. 3 представлены средние значения концентрации азитромицина во времени (в линейных координатах) после однократного введения препаратов. Как видно из сравниваемых кривых характер зависимости «концентрация – время» практически не отличается. Максимальная концентрация препарата составляла для **АЗИТРОМИЦИНА** – $0,214 \pm 0,089$ мкг/мл и для **СУМАМЕДА** – $0,220 \pm 0,105$ мкг/мл, время достижения максимальной концентрации для обоих препаратов было одинаковым 2,5 часа.

Результаты расчетов фармакокинетических параметров препаратов **АЗИТРОМИЦИН** и **СУМАМЕД** представлены в табл. 3. Из таблицы видно, что средние значения всех рассчитанных параметров фармакокинетики статистически достоверно не отличаются. Так, площадь под фармакокинетической кривой (от нуля до последней точки забора крови) для препарата Азитромицин составляла – $1,84 \pm 0,4$ мкг ч/мл, а для препарата Сумамед – $1,94 \pm 0,49$ мкг ч/мл. Остальные параметры фармакокинетики ($T_{1/2}$, MRT , C_{max}/AUC_{0-1}) также были близкими. Среднее значение биодоступности (f') препарата Азитромицин по отношению к препарату Сумамед составляет $0,96 \pm 0,11$ (доверительный интервал $0,90 \div 1,02$). Среднее значение отношения максимальных концентраций (f'') для изучаемых препаратов составляет $0,99 \pm 0,17$ (доверительный интервал $0,91 \div 1,108$).

Таким образом, не выявлено статистически достоверных различий в процессе всасывания (как по полноте, так и по скорости всасывания) препаратов **АЗИТРОМИЦИН** и **СУМАМЕД**.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вышковский Г. В. (ред.), Энциклопедия лекарств, ООО «РЛС-2002», Москва (2002), с. 58–59.
2. Kees F., Spangler S., Wellenbofer M., *Chromatogr. J. B: Biomed. Appl.*, 812(1–2), 287 – 293 (1998).
3. Raines D. A., Yusuf A., Jabak M. H. et al., *Ther. Drug. Monit.*, 20(6), 680 – 684 (1998).
4. Shepard F. M., Dutha G. S., Ferraina R. A. et al., *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, 565(1–2), 321–337 (1991).
5. Torano J. S., Guchelaar H. J., *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, 729(1–2), 89 – 97 (1998).
6. Fonda H. G., Schneider R. F., *Ther. Drug. Monit.*, 17(2), 179 – 183 (1995).
7. Методические рекомендации по проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов, МЗ РФ, Москва (2001).

Сравнительное фармакокинетическое исследование биоэквивалентности двух пролонгированных лекарственных форм метопролола

А.В.Соколов, Ю.Б.Белоусов, И.Ф.Тищенко
Кафедра клинической фармакологии РГМУ, Москва.

ВВЕДЕНИЕ

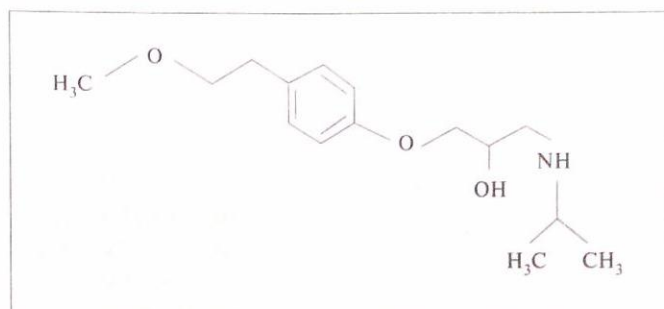
Большое количество выпускаемых различными фирмами воспроизводимых лекарственных препаратов совсем не означает одинакового фармакологического и терапевтического действия этих лекарств. Для того чтобы ориентироваться в правильном назначении того или иного препарата, врачу необходимо знать, чем отличаются воспроизводимые лекарства (иными словами — знать отличия фармакокинетических параметров этих препаратов). На основании этих знаний врач может грамотно назначать дозировку лекарства и подбирать оптимальные интервалы дозирования.

Во всем мире для подтверждения одинаковой терапевтической активности воспроизводимых препаратов проводятся исследования биоэквивалентности. При этом в качестве основного критерия выбирается достаточно «близкая» биодоступность изучаемых лекарственных средств, определяемая сравнением таких фармакокинетических показателей, как площадь под кривой в координатах «концентрация-время» — (AUC), $C_{\max}$ (максимальная концентрация), $T_{\max}$ (время достижения максимальной концентрации), MRT (среднее время удержания) и некоторых других. При одинаковых значениях площадей (AUC), то есть относительной степени всасывания близкой к единице, совсем необязательно исследуемый препарат и препарат, выбранный в качестве стандарта, будут иметь близкие по значению показатели скорости всасывания.

Целью настоящего исследования было исследовать биоэквивалентность двух препаратов пролонгированного действия, содержащих метопролол в одинаковых количествах — 50 мг, на основании полученных фармакокинетических данных — «БЕТАЛОК ЗОК» и «ЭМЗОК».

Метопролол — белый кристаллический порошок. Хорошо растворим в воде, умеренно растворим в этаноле, слабо растворим в дихлорметане.

Кардиоселективный β_1 -адреноблокатор без внутренней симпатомиметической активности. Оказывает гипотензивное, антиангинальное и антиаритмическое



действие. Блокирует преимущественно β_1 -адренорецепторы сердца, не обладает внутренней симпатомиметической и мембраностабилизирующей активностью. Уменьшает сердечный выброс и САД, замедляет сердечный ритм, ослабляет стимулирующий эффект катехоламинов на миокард при физической нагрузке и умственном перенапряжении, предупреждает рефлекторную ортостатическую тахикардию. Антигипертензивное действие обусловлено уменьшением сердечного выброса и синтеза ренина, угнетением активности ренин-ангиотензиновой системы и ЦНС, восстановлением чувствительности барорецепторов и, в итоге, уменьшением периферических симпатических влияний. Гипотензивный эффект достигается быстро и продолжается в течение 6 часов. При применении метопролола сукцината — клинический эффект сохраняется 24 ч. Антиангинальный эффект является следствием уменьшения частоты и силы сердечных сокращений, энергетических затрат и потребности миокарда в кислороде. Антиаритмическое действие проявляется в устранении аритмогенных симпатических влияний на проводящую систему сердца, замедлении синусового ритма и скорости распространения возбуждения через AV узел. Понижает автоматизм синусового узла, уменьшает ЧСС, замедляет AV проводимость, снижает сократимость и возбудимость миокарда, уменьшает минутный объем сердца, снижает потребность миокарда в кислороде.

Фармакокинетика метопролола всесторонне представлена в работах [1-6]. При пероральном приеме

Таблица 1

Демографические данные участников исследования

№ п/п	Ф И О	Возраст	Масса тела	Рост	Пол	Группа
1	Б.А.П.	37	90	187	М	А
2	Н.Ю.К.	47	80	176	М	А
3	А.Н.В.	32	52	160	Ж	А
4	И.Л.Н.	45	60	154	Ж	А
5	И.П.Е.	20	60	170	Ж	А
6	М.Л.А.	45	65	162	Ж	А
7	М.Н.В.	43	80	160	Ж	А
8	К.Н.М.	45	70	156	Ж	А
9	К.Н.А.	20	73	156	Ж	А
10	К.А.И.	45	70	170	М	Б
11	Л.Т.А.	24	60	154	Ж	Б
12	С.Н.В.	45	90	160	Ж	Б
13	С.С.Г.	45	94	176	М	Б
14	Л.С.Н.	30	56	176	Ж	Б
15	У.А.М.	40	90	187	М	Б
16	П.Л.С.	44	70	160	Ж	Б
17	Б.Е.Н.	33	60	168	Ж	Б
18	Д.Л.В.	45	70	160	Ж	Б
	Среднее зн.	38,05	71,70	166,2	-	-
	Станд.ош.±	2,18	3,07	2,49	-	-

Таблица 2

№ п/п	Параметр	Группа «А»	Группа «Б»
1	количество чел.	9	9
2	возраст, лет	37,25	39,3
3	масса тела, кг	69,70	73,4
4	доза, мг	1 табл. (50 мг)	1 табл. (50 мг)

обычных лекарственных форм метопролола в дозе 50 мг препарат быстро абсорбируется и достигает максимальной концентрации ($C_{\max}$) от 5 до 22 нг/мл, а время ее достижения ($T_{\max}$) находится между 2,5 и 14 ч после приема. $T_{1/2}$ колеблется от 3 до 7 часов. Биодоступность метопролола тартрата составляет около 50% при первом приеме и возрастает до 70% при повторном применении. Метаболизируется в печени с получением двух активных метаболитов. При пероральном приеме менее 5% принятой дозы выводится с мочой в неизменном виде. Быстро распределяется в тканях, проникает через гематоэнцефалический и плацентарные барьеры, обнаруживается в грудном молоке в более высокой концентрации, чем в плазме. При нарушении функции почек биодоступность препарата не изменяется, но может снижаться скорость экскреции метаболитов.

В данном исследовании определяли относительную биодоступность двух препаратов метопролола пролонгированного действия, представленных на рынке России, при однократном пероральном приеме препарата. Тестируемым препаратом (Test) являлся генерический препарат «ЭМЗОК», содержащий метопролол тартрат, а в качестве препарата сравнения использовали оригинальный препарат «БЕТАЛОК ЗОК» (Standard), содержащий метопролол сукцинат. Оба препарата применялись в дозе 50 мг. Изученные данные *in vitro* говорили о примерно одинаковых фармацевтических характеристиках этих препаратов. Но поскольку данные, полученные *in vitro*, не всегда являются прогностически достоверными в отношении действия препарата *in vivo*, было интересно провести исследование биоэквивалентности на здоровых добровольцах для оценки взаимозаменяемости оригинального и генерического препарата. В настоящей работе представлены экспериментальные данные, полученные в результате проведенного исследования.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Участники

В работу были включены 18 здоровых добровольцев, разбитых на 2 группы (группа А и группа Б). Группы были рандомизированы по полу, возрасту, массе тела. Демографические и некоторые другие данные представлены в табл. 1 и 2.

После того как врач-исследователь проинформировал участников о целях, ходе и возможном риске проведения данного исследования, все добровольцы подписали информированное согласие на участие в исследовании. Они были подобраны на основании данных анамнеза, физикального обследования, в ходе которого было установлено отсутствие видимой патологии печени, почек, сердца, ЖКТ и крови или каких-либо острых или хронических заболеваний.

Всесторонний лабораторный скрининг проводили

в течение 7 дней до начала исследования в целях подтверждения удовлетворительного состояния участников. Другими критериями включения являлись отрицательные тесты на содержание наркотиков, алкоголя, ВИЧ и др. Исследование проводилось согласно требованиям, указанным в методических рекомендациях по проведению исследований по биоэквивалентности в Российской Федерации от 2002 г.

Исследуемые препараты

В качестве тестируемого препарата был выбран «ЭМЗОК» (Галена, Чешская Республика) в таблетках по 50 мг (№ серии 3A1070403), а в качестве препарата сравнения избрали «БЕТАЛОК ЗОК» (Астра Зенека, Швеция) в таблетках по 50 мг (№ серии D13085).

Дизайн исследования

Исследование было рандомизированным двойным перекрестным, основанным на однократном приеме дозы препарата 18 здоровыми добровольцами. Как участники, так и исследователи могли знать, какой препарат получает тот или иной человек в каждый период, однако этой информацией не обладала аналитическая группа.

Каждый доброволец утром во время завтрака принимал 1 таблетку препарата (50 мг), которые запивал

200 мл кипяченой воды комнатной температуры. Группа А получала 1 таблетку (50 мг) препарата «БЕТАЛОК ЗОК», а группа Б — 1 таблетку (50 мг) препарата «ЭМЗОК». Через 7 дней (период отмывки) группа А получала 1 таблетку (50 мг) препарата «ЭМЗОК», а группа Б — 1 таблетку (50 мг) препарата «БЕТАЛОК ЗОК».

Пробы крови в количестве 5,0 мл получали из локтевой вены методом венопункции или из установленного в локтевой вене катетера. Пробы отбирали в стерильные, герметично закрывающиеся одноразовые пластиковые пробирки. Из крови готовили сыворотку обычным способом (инкубация при комнатной температуре 30–45 мин, центрифугирование при 5600 об/мин, 10 мин) и сразу замораживали полученную сыворотку при -18°C . Анализ сыворотки на содержание в ней метопролола проводили не позже, чем на 2 — 3 суток. Пробы крови отбирали до и через 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0; 24 и 48 часов после приема препарата по следующей схеме:

Группа «А» — до и через 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0; 24 и 48 часов после приема препарата «БЕТАЛОК ЗОК» (1 таблетка — 50 мг);

Группа «Б» — до и через 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0; 24 и 48 часов после приема препарата «ЭМЗОК» (1 таблетка — 50 мг).

После периода отмывки (7 дней) группа «А» принимала по той же схеме препарат «ЭМЗОК», а группа «Б» — препарат «БЕТАЛОК ЗОК».

Аналитический метод

Из многочисленных описанных в литературе методов определения метопролола в сыворотке крови в основном применяются методы, основанные на применении обратноточной ВЭЖХ [7–10].

В основном, эти методы основаны на применении ВЭЖХ с ультрафиолетовым или флуоресцентным детектированием. При этом применяется однократная или многократная экстракция препарата из сыворотки крови органическим растворителем с последующим упариванием в токе инертного газа или воздуха при низкой температуре (30–50 $^{\circ}\text{C}$), растворением сухого остатка в ограниченном объеме растворителя (в большинстве случаев — элюента) и анализом полученного раствора на обратноточной хроматографической колонке. Метод с использованием осаждения белков крови с последующим анализом надосадочной жидкости с помощью ВЭЖХ в случае определения препаратов этой группы не применим из-за низкой чувствительности метода и большого количества эндогенных веществ, мешающих определению. Кроме того, риск загрязнения хроматографической колонки недоосажденными белками крови из супернатанта при данном способе определения существенно возрастает.

Нами был использован модифицированный метод определения, описанный в работе [8]. Модификация состояла в том, что была предложена новая подвижная

фаза, а хроматографическое разделение проводили на микроколоне Diasfer-100- C_{18} , 6 мкм. Препарат извлекали из сыворотки крови экстракцией хлористым метилом или хлороформом после подщелачивания пробы сыворотки разбавленным раствором едкого натра (коэффициент экстракции $98 \pm 1,5\%$).

К образцу сыворотки крови объемом 0,5 мл (здесь и далее — точные объемы) добавляли 100 мкл 0,1 н раствора едкого натра и 3,0 мл хлороформа. Смесь подвергалась энергичному встряхиванию на вибромиксере 2 мин, центрифугированию в течение 10 мин при 5600 об/мин. Затем 2,7 мл нижнего органического слоя отбирали автоматической пипеткой и упаривали экстракт в токе азота при 40 $^{\circ}\text{C}$. Сухой остаток растворяли в 120 мкл подвижной фазы и 50 мкл полученного раствора вводили в хроматографическую систему. Хроматографическое разделение проводили при комнатной температуре ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) на микроколоне Diasfer-100- C_{18} , зернением 6 мкм и размерами 2x150 мм (сорбент разработан и упакован ЗАО «БиоХимМак СТ»). В качестве детектора использовали проточный спектрофлуориметр «Shimadzu» — 551 (Япония), детектирование проводили при длинах волн ($\lambda_{\text{em}} = 222$ и $\lambda_{\text{ex}} = 305$ нм). В качестве подвижной фазы использовали смесь 87,7% ацетонитрила, 12,2% воды и 0,031% конц. ортофосфорной кислоты. Объемная скорость элюирования составляла 0,4 мл/мин. Концентрацию препарата рассчитывали по методу абсолютной калибровки.

Калибровочные операции проводили следующим образом: к 0,5 мл интактной сыворотки крови, полученной обычным способом добавляли известное количество препарата (стандартный раствор в метиловом спирте) для получения растворов с концентрацией 3, 10, 15, 40 и 90 нг/мл сыворотки (5 растворов). Полученные калибровочные растворы обрабатывали и анализировали описанным выше способом. Калибровочный график в изученном интервале концентраций представлял собой прямую линию ($K_{\text{корр.}} = 0,987$) описываемую уравнением $C = 0,143xh$, где

C — концентрация метопролола в сыворотке крови (в нг/мл), h — высота хроматографического пика (в мм).

Каждая проба крови анализировалась не менее двух раз.

Калибровочные кривые строили по результатам хроматографического анализа на основе измерений высот хроматографических пиков. Результаты анализа контрольных образцов вносили в таблицу, рассчитывали средние значения, стандартные ошибки и затем строили калибровочный график.

Измеренные значения концентраций на графике были линейны во всем исследованном диапазоне (0–100 нг/мл) и график представлял прямую линию.

Контрольные образцы для получения калибровочных графиков готовили трижды с интервалом в одну неделю. Образцы сыворотки крови, содержащие

известное количество метопролола и находившиеся в морозильной камере при -18°C в течении двух недель подвергали регулярному контрольному хроматографическому анализу каждые два дня. Установлено, что количество метопролола оставалось стабильным в течении всего периода наблюдения.

Порог чувствительности метода (абсолютная чувствительность по метопрололу в анализируемой пробе) составляла не ниже 0,5 нг метопролола в мл сыворотки крови. Относительная ошибка определения составила 8,79% при концентрации препарата 15 нг/мл.

Фармакокинетические расчеты

Основные фармакокинетические параметры метопролола, полученные в результате исследования двух препаратов приведены в табл 3. Значения AUC для метопролола (площадь под кривой «концентрация — время») были вычислены методом трапеции. Все значения AUC_{0-48} для тестового препарата и стандарта превышали соответствующие значения 80% $AUC_{0-\infty}$, поэтому для статистических сравнений был выбран показатель AUC_{0-48} .

Кроме того, рассчитывались значения отношений $C_{\max}/AUC$, значения MRT (среднее время удержания) и VRT (дисперсия среднего времени удержания).

Таблица 3

Фармакокинетические параметры метопролола после однократного перорального приема таблеток 50 мг «ЭМЗОК» (Test) и «БЕТАЛОК ЗОК» (Standard) (Среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)

	$T_{\max}$, ч	$C_{\max}$, нг/мл	MRT, ч	AUC_{0-48} , нг·ч/мл
«ЭМЗОК»	$4,6 \pm 1,24$	$18,2 \pm 2,99$	$15,65 \pm 0,82$	$277,6 \pm 53,8$
«БЕТАЛОК ЗОК»	$8,1 \pm 1,61$	$10,4 \pm 2,19$	$20,05 \pm 1,26$	$249,4 \pm 53,9$

Для показателей сравнения AUC, $C_{\max}$, $T_{\max}$, MRT, VRT и $C_{\max}/AUC$ на основе дисперсионного анализа ANOVA и непараметрического подхода были рассчитаны 90% доверительные интервалы для отношений (AUC , $C_{\max}$) или разностей ($T_{\max}$, MRT, VRT и $C_{\max}/AUC$) соответствующих средних значений.

Тестирование статистических гипотез проводилось на уровне значимости 5 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки биоэквивалентности препаратов «ЭМЗОК» (test) и «БЕТАЛОК ЗОК» (standard) был проведен статистический анализ полученных фармакокинетических данных. В качестве основных переменных при этом были выбраны показатели AUC, MRT, $C_{\max}$, $T_{\max}$, отношения $C_{\max}/AUC$, оцениваемые непосредственно по измеренным фармакокинетическим кривым на основе некомпартментного подхода. Период времени наблюдения T был равен 48 часам.

На рис. 1 представлены графики изменения сывороточных концентраций метопролола во времени после однократного приема таблеток «БЕТАЛОК ЗОК» и «ЭМЗОК» (усредненные данные). Как видно из сравнения этих графиков, характер кривых зависимости содержания метопролола в крови после приема таблеток «БЕТАЛОК ЗОК» и «ЭМЗОК» отличается.

Препарат из исследуемых форм достаточно продолжительное время всасывается в организме, но времени достижения максимальной концентрации и сами значения максимальной концентрации значительно различаются. Так, в случае применения препарата «ЭМЗОК», содержание его в крови достигает максимального значения ($18,2 \pm 2,99$ нг/мл) к $T_{\max} = 4,60 \pm 1,24$ час. В случае применения препарата «БЕТАЛОК ЗОК» эти величины составляют по нашим данным

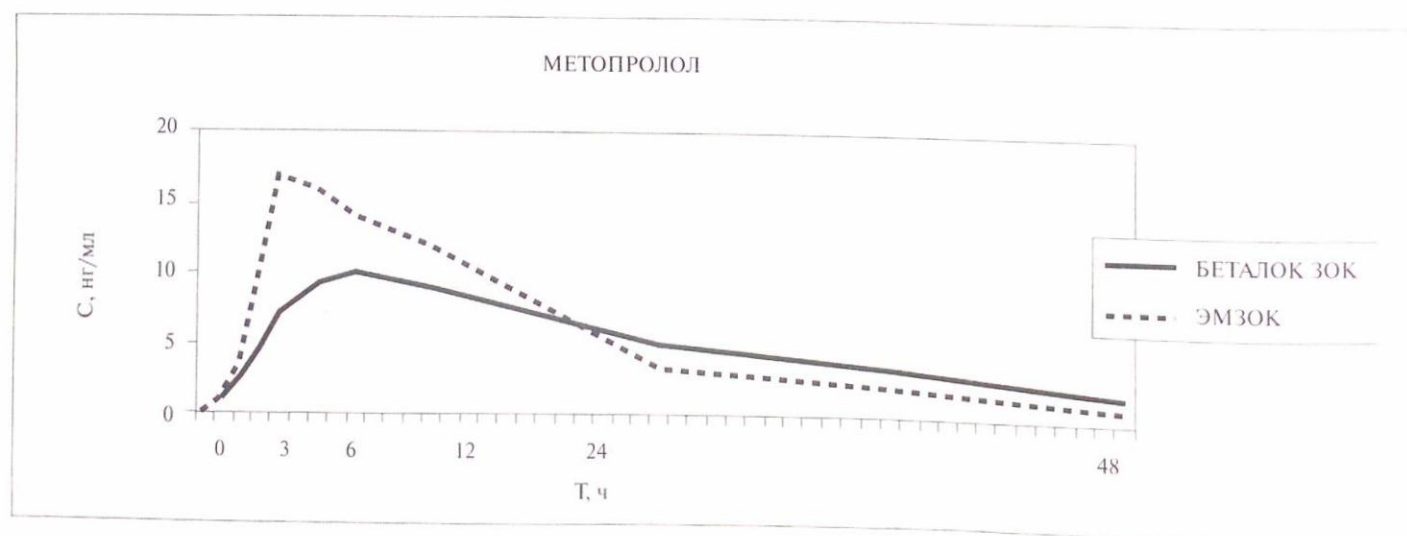


Рис. 1. Динамика концентраций метопролола в сыворотке крови добровольцев после перорального однократного приема 50 мг «БЕТАЛОК ЗОК» и «ЭМЗОК» (Средние значения).

($T_{\max} = 8,1 \pm 1,61$ час и $C_{\max} = 10,4 \pm 2,19$ нг/мл), затем концентрация метопролола в крови монотонно убывает и после 48 часов после приема таблеток «БЕТАЛОК ЗОК» и «ЭМЗОК» практически не определяется. Наблюдаемые различия в концентрациях метопролола в крови добровольцев после приема таблеток «БЕТАЛОК ЗОК» и «ЭМЗОК» могут быть объяснены различием в процессах всасывания, возможно вызванным различием в составах наполнителей лекарственных форм.

Для статистического оценивания были сделаны предположения о распределении основных параметров: 1) параметр AUC и $C_{\max}$ имеют ln-нормальное распределение, 2) параметры MRT, VRT и $C_{\max}/AUC$ — нормальное. Статистический анализ включал в себя следующие процедуры: вычисление базовой и порядковой статистики, дисперсионный анализ, анализ остатков, графические методы, вычисление доверительных интервалов, проверка интервальных критериев, непараметрического критерия знаковых рангов Уилкоксона, построение гистограммы распределения парных геометрических средних отношений биодоступности.

В соответствии с правилами *a-priori* были установлены допустимые границы для отношений биодоступности [0,8-1,25] и отношений максимальных концентраций [0,75-1,33]. При этом средние значения отношений биодоступности должны быть в пределах 0,9-1,1, а отношения максимальных концентраций в пределах 0,85-1,15. Кроме того, относительные различия между средними значениями для всех остальных параметров сравнения не должны превышать $\pm 20\%$.

Средние значения lnAUC в пределах интервала 0 — 48 часов были оценены как $5,61 \pm 0,2$ для test и $5,49 \pm 0,24$ для standard.

Среднее значение $C_{\max}$ для test было $18,2 \pm 2,99$ нг/мл и для standard — $10,4 \pm 2,19$ нг/мл.

Среднее значение $T_{\max}$ было $4,6 \pm 1,24$ часов для test и $8,1 \pm 1,61$ для standard. Значение парного t-критерия для разности средних значений равно -7,62.

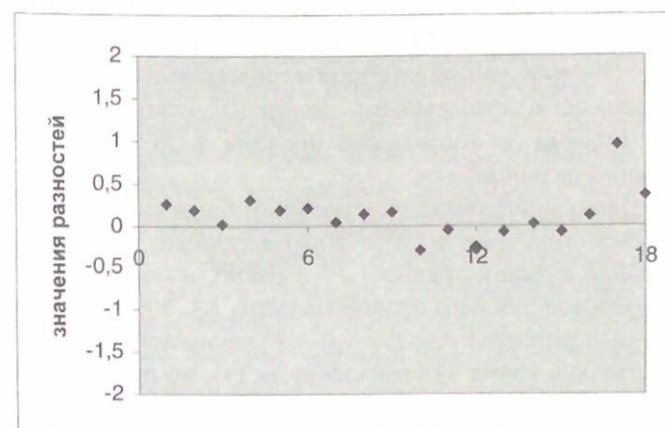
Для MRT — средние значения были оценены как $15,65 \pm 0,82$ часов для test и для standard $20,05 \pm 1,26$ часов. Значение парного t-критерия для разности средних значений равно -12,7.

Таблица 4

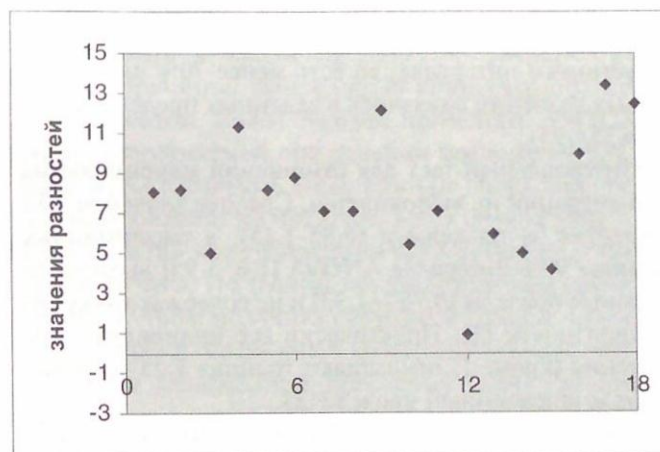
Фармакокинетические параметры метопролола после однократного перорального приема таблеток 50 мг «ЭМЗОК» (Test) и «БЕТАЛОК ЗОК» (Standard), характеризующие пролонгированную форму (Среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)

	$t_{75\%} C_{\max}$, ч	% swing, %	% PTF, %
«ЭМЗОК»	$4,6 \pm 2,14$ (CV=46,5%)	$489,6 \pm 215$ (CV=43,9%)	$131,2 \pm 20$ (CV=15,2%)
«БЕТАЛОК ЗОК»	$11,3 \pm 2,1$ (CV=18,6%)	$117,7 \pm 60,8$ (CV=51,7%)	$53,2 \pm 20,7$ (CV=38,9%)

Ln AUC



$C_{\max}$



MRT

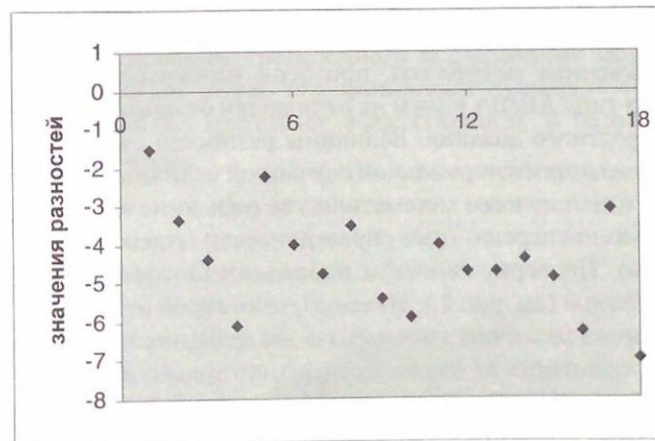


Рис.2. Индивидуальные значения попарных разностей основных фармакокинетических параметров метопролола.

Для VRT — средние значения были оценены как $116,7 \pm 11,54$ часов в квадрате и $140,0 \pm 6,35$ часов в квадрате, соответственно для test и standard.

Для параметров сравнения $T_{\max}$, MRT, VRT, $C_{\max}/AUC$ нулевая гипотеза о том, что различия в средних значениях показателей не вызваны различия-

ми между сравниваемыми препаратами, была отвергнута ($p < 0,01$). Полученные с помощью метода ANOVA 90%-ные доверительные интервалы для разности средних значений этих параметров не содержат точку эквивалентности, существенно смещены, некоторые из них выходят за допустимые пределы $\pm 20\%$ относительных различий.

Для отношений биодоступности были рассчитаны среднее значение и 90% доверительный интервал. Среднее значение равно 1,17 и располагается правее допустимой для него правой границы 1,1. 90% доверительный интервал ANOVA 1,0-1,26 несимметричен относительно точки эквивалентности (1), но практически находится внутри установленных пределов [0,8; 1,25]. Точка эквивалентности является левой границей рассчитанного доверительного интервала для отношения средних значений. Два индивидуальных отношений биодоступности были меньше и 4 больше границ допустимого интервала, то есть менее 70% индивидуальных значений оказались в заданных пределах (правило 75/125).

Интервальный тест для отношений максимальных концентраций не выполняется. Среднее значение 1,82 находится за пределами (0,85-1,15), а рассчитанные границы 90% интервала ANOVA [1,6; 1,95] выходят за заданные пределы [0,75 – 1,33] и не содержат точку эквивалентности (1). Практически все индивидуальные значения (кроме 1) превышают границу 1,25 и превышают установленный предел 1,33.

При использовании процедуры анализа индивидуальных различий рассматриваются не отдельно данные для сравниваемых препаратов, а столбец их разностей (сопоставление пар) в предположении об отсутствии влияния последовательности получения препаратов на полученные результаты, при этом перекрестный дизайн типа АВ/ВА ничем не отличается от обычного перекрестного дизайна. Величины разностей считаются реализациями нормальной случайной величины, которая имеет нулевое математическое ожидание и неизвестную дисперсию (при справедливости нулевой гипотезы). Проверку гипотезы проводили по парному t – критерию (см. рис.2.). Нулевую гипотезу об отсутствии влияния различий в препаратах на значения показателей сравнения не удалось отвергнуть только для параметра $\ln AUC$. Различия средних значений для всех остальных параметров сравнения были признаны статистически значимыми ($p < 0,001$).

Непараметрический критерий знаковых рангов Уилкоксона и построенные гистограммы (рис.3.) демонстрируют несимметричное распределение попарных геометрических средних отношений AUC (рис. 3А) и особенно отношений C_{max} (рис. 3Б) вокруг точки эквивалентности. Практически все (кроме трех) значения попарных геометрических средних отношений C_{max} превышают значение 1,25, и большинство их располагается правее допустимой верхней границы 1,33.

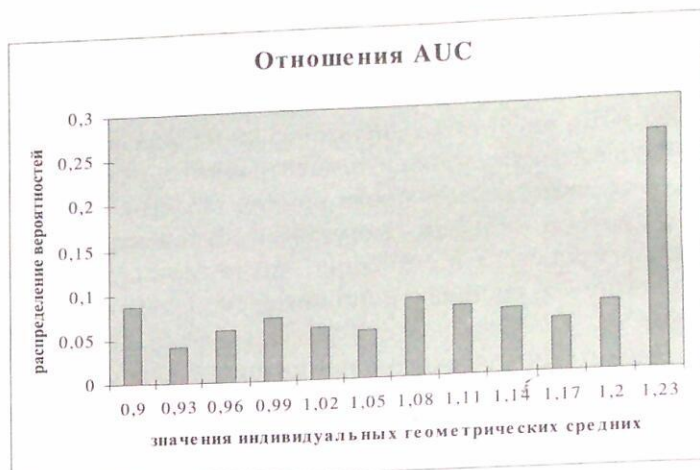


Рисунок 3А

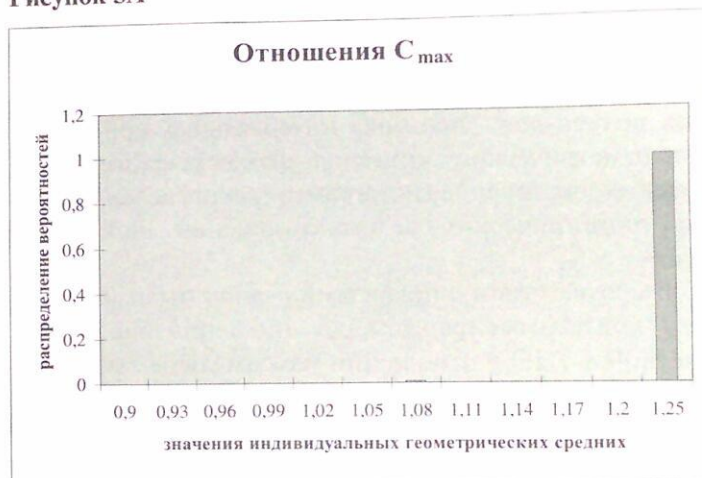


Рисунок 3Б

Рисунок 3. Гистограммы распределения попарных геометрических средних: А – индивидуальных отношений биодоступности, Б – индивидуальных отношений максимальных концентраций (непараметрический метод).

Значение медианного элемента равно 1,78. Непараметрический доверительный интервал, полученный с помощью данного подхода, был оценен как [1,54; 2,02], и он полностью лежит вне допустимых пределов.

Из приведенных расчетов видно, что практически все средние значения параметров, характеризующих процесс всасывания метопролола при приеме изучаемых лекарственных форм «БЕТАЛОК ЗОК» и «ЭМ-ЗОК», кроме AUC (оценка степени всасывания), статистически значимо различаются (См. табл.3).

В этом исследовании для косвенной оценки и сравнения скоростей всасывания препаратов использовались такие показатели, как C_{max} , T_{max} , MRT, отношение C_{max}/AUC . Отсутствие биоэквивалентности изучаемых препаратов в отношении скорости процессов всасывания было продемонстрировано в этом исследовании для всех перечисленных показателей. Но для пролонгированных форм важна также их способность уменьшать колебания концентрации в интервале дозирования. Поэтому при сравнении пролонгированных лекар-

ственных форм часто применяются такие показатели, как продолжительность сохранения плато концентрации (оценивается, например, с помощью параметра $t_{75\% C_{\max}}$ — периоды времени превышения концентрацией 75% уровня $C_{\max}$, ч) и величина колебаний концентрации от максимального до минимального уровня в интервале дозирования (оценивается, например, с помощью параметра

$$\% swing = 100 \cdot (C_{\max} - C_{\min}) / C_{\min}$$

или параметра

$$\% PTF = 100 \cdot (C_{\max} - C_{\min}) / C_{av} = 100 \cdot (C_{\max} - C_{\min}) / (AUC / \tau).$$

Результаты расчетов этих параметров для сравниваемых препаратов содержатся в таблице 4. Поскольку препарат «БЕТАЛОК ЗОК» обычно назначают один раз в сутки, для оценки минимальной концентрации был взят интервал дозирования $\tau = 24$ часа (C_{24h}).

Статистические сравнения на основе 90% доверительных интервалов ANOVA продемонстрировали наличие статистически значимых различий для средних значений выбранных показателей. Кроме того, существенно отличается коэффициент вариации (CV, %) показателя $t_{75\% C_{\max}}$, то есть межиндивидуальные различия этого показателя значительно больше выражены у тестового препарата.

Полученные результаты основаны на данных фармакокинетического исследования после однократного приема пероральной дозы препарата. Результаты, относящиеся к последним трем показателям, не могут быть прямо распространены на случай многократного дозирования, особенно такого препарата, как метопролол, который при пероральном приеме характеризуется нелинейной (зависящей от времени) кинетикой, приводящей к росту биодоступности из-за выраженного насыщения эффекта первого прохождения через печень.

Выводы:

Полученные результаты не позволяют сделать вывод о совпадении основных фармакокинетических параметров метопролола и о биоэквивалентности исследуемых лекарственных форм. Препарат «БЕТАЛОК ЗОК» обладает лучшими фармакокинетическими характеристиками, снижающими колебания концентрации в интервале дозирования, т.е. позволяющими более надежно поддерживать постоянный уровень концентрации метопролола (явно выраженное плато на фармакокинетической кривой). Препарат «ЭМЗОК» значительно быстрее всасывается из лекарственной формы, уровень максимальной концентрации метопролола в крови существенно выше, чем при применении препарата «БЕТАЛОК ЗОК», т.е. этот препарат более напоминает обычную лекарственную форму метопролола. Более высокие пиковые концентрации, создаваемые в крови препаратом ЭМЗОК, могут явиться причиной зависящих от концентрации побочных эффектов. Таким образом применять ЭМЗОК по схеме, применяемой при лечении препаратом «БЕТАЛОК ЗОК» (суточные дозы, разовые дозировки, режимы дозирования) не представляется возможным. «БЕТАЛОК ЗОК» назначают один раз в сутки, т.е. с интервалом 24 часа. По нашим предварительным расчетам, для того чтобы получить сравнимые уровни метопролола в крови, сравнимые колебания концентрации в интервале дозирования, обеспечивающие сравнимую эффективность при применении препарата «ЭМЗОК», его необходимо назначать два раза в сутки. В настоящее время нами проводятся расчеты и сравнение режимов дозирования для этих двух препаратов на основе фармакокинетического моделирования.

На основании проведенного исследования можно сделать вывод о том, что применение препарата «БЕТАЛОК ЗОК» повышает эффективность и безопасность лечения.

ЛИТЕРАТУРА.

- Malini Haria, Greg L. Plasker, Anthony Markham — *Drugs*, 59, 1, p. 141-157, 2000.
 C.G. Regardt, K.O. Borg, et al — *J. Pharmacokinet. Biopharmac.*, 2, 4, p. 347-364, 1974.
 I. Darmansjah, E. Wong et al — *J. Clin. Pharmacol.*, 30 (Suppl2), p. 39-45, 1990.
 A. Sandberg, et al — *J. Clin. Pharmacol.*, 30, 2(Suppl), p. 2-16, 1990.
 J. Godbillon, A. Gerardin et al — *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 24, 2(Suppl), p. 655-660, 1983.
 A. Sandberg, G. Ragnarson, et al — *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 33 [Suppl], p. 3-7, 1988.
 M.S. Lennard, J.H. Silas. *J. Chromatogr.*, 272, p. 205-209, 1988.
 D.B. Pautler, W.J. Jusko — *J. Chromatogr.*, 228, p. 215-222, 1982.
 J. Godbillon, M. Duval. — *J. Chromatogr. BA*, 309, p. 198-302, 1984.
 Yukio Horai, Takashi Ishiraki, et al., *Ther. Drug Monit.*, 10, №4, p. 428-33, 1988.
 Справочник по прикладной статистике. Под редакцией Э.Лойда, У.Ледермана. М. — Финансы и статистика -1990.
 M. Gibaldi, *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*, LEA & FEBIGER Philadelphia — London, 1991.
 H.G. Fluehler etc., *An Aid to Decision — Making in Bioequivalence Assessment*, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 2, 2, 1981, 235-243.

Фармакокинетический анализ бимодальных дозозависимостей

К.Г. Гуревич

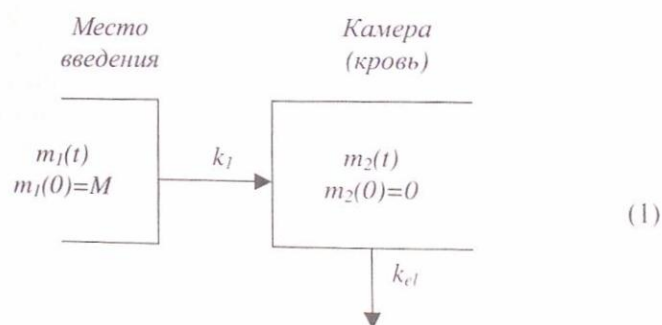
Кафедра ЮНЕСКО при МГМСУ «Здоровый образ жизни — залог успешного развития», г. Москва

В работе исследованы фармакокинетические эффекты, наблюдающиеся при наличии бимодальной зависимости доза-эффект. Показано, что наличие и отсутствие бимодальных дозовых эффектов определяется свойствами систем проведения и усиления биологического сигнала, а также концентрацией биологически активного вещества и его связыванием с белками крови. Бимодальные дозовые зависимости могут наблюдаться только для тех систем проведения и усиления сигнала, у которых есть отрицательная обратная связь: торможение избытком субстрата или продукта и т.д. Изменение степени связывания биологически активного вещества с белками крови и/или его концентрации в крови может привести к драматическому изменению формы биологического ответа: от бимодального к мономодальному и наоборот.

В фармакологии принято считать, что биологический ответ пропорционален силе воздействия на систему, при этом при воздействии чрезмерной силы возможно угнетение ответа из-за истощения «внутреннего резерва» клеток [1]. Однако в последние годы при изучении эффектов большого числа биологически активных веществ было показано, что дозовая зависимость имеет более сложный характер: в ответ на воздействия малой силы наблюдается клеточный ответ, на воздействия средней силы ответ отсутствует, на более интенсивные вновь проявляется (рис. 1). Дозовые зависимости такого типа называют бимодальными или, если максимумов более чем два, — полимодальными. Бимодальные дозовые кривые описаны для большого числа биологически активных веществ (см. таблицу), а также для действия ионизирующей радиации [2, 3].

При всем разнообразии химической природы веществ, имеющих бимодальные эффекты, при различии этих эффектов у них есть одно общее свойство: все вещества, представленные в таблице, не влияют на клеточные функции непосредственно, а оказывают влияние опосредованно, через системы проведения и усиления сигнала, то есть, это вещества, имеющие регуляторную природу. Исходя из такого заключения, ранее мы предложили возможный механизм формирования бимодальных дозовых зависимостей [4], основанный на свойствах систем каскадного проведения и усиления рецепторного сигнала в предположении, что некоторые из каскадных реакций имеют системы обратной связи (субстратное торможение, ингибирование избытком продукта и т.д.). В настоящей статье мы проводим фармакокинетический анализ развития биологического ответа для бимодальных дозовых зависимостей.

В живых системах биологический ответ определяется связыванием клеточных рецепторов с эндо- или экзогенными лигандами [5, 6]. В большинстве случаев эти лиганды не вырабатываются и не вводятся непосредственно в месте действия, а транспортируются по системе крови, лимфатической, межтканевой жидкости и т.д. Такому транспорту в простейшем случае отвечает линейная фармакокинетическая модель.



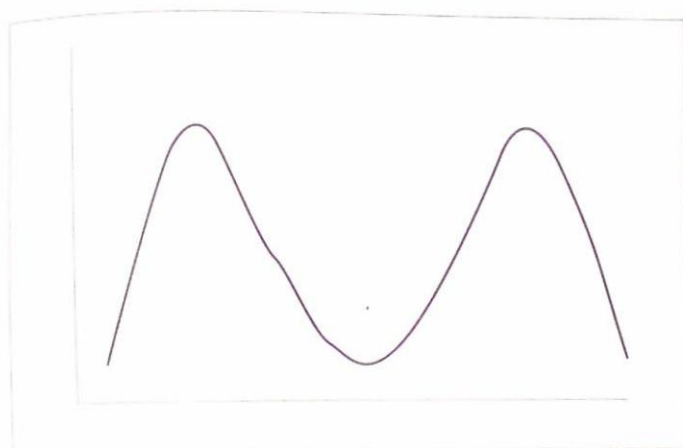
Где m_i — масса лиганда в камерах, k_1 , k_{el} — константы поступления и элиминации лиганда в кровь и из крови.

Большинство лигандов обратимо связываются с белками крови, при этом основными белками-переносчиками являются альбумины. Этому связыванию отвечает следующая схема:



где L — лиганд, P — белок-переносчик, LP — их комплекс, K — константа диссоциации.

Бимодальная зависимость «доза-эффект»



Обычно концентрация лиганда много меньше концентрации связывающего белка. Так, например, концентрация альбуминов составляет порядка 10^{-5} М, при этом концентрация гормона роста, фактора роста нервов — 10^{-9} – 10^{-11} М [7]. Поэтому концентрацию белка-переносчика можно считать неизменной вследствие взаимодействия, описываемого схемой (2). Тогда концентрация комплексов лиганда с транспортными белками описывает следующее уравнение (аналог уравнения Кларка для рецепторного связывания):

$$[LP] = \frac{[L_0][P]}{[L_0] + K}, \quad [P] = [P_0], \quad (3)$$

где $[L_0]$, $[P_0]$ — начальные концентрации лиганда и белка-переносчика.

Рис. 1

Для большинства лигандов $K \gg [L]$. Тогда (3) преобразуется так:

$$[LP] = \alpha[L_0], \quad (4)$$

где $\alpha = [P]/K$ — константа, так как в норме концентрация транспортных белков крови поддерживается в организме на постоянном уровне.

Тогда концентрация свободного лиганда определяется формулой:

$$[L] = (1 - \alpha)[L_0] = \beta[L_0], \quad (5)$$

где β — константа, «степень связывания». Если $\beta=0$, то весь лиганд находится в связанном виде.

Для фармакокинетической модели, описываемой схемой (1), возможно выведение только связанной (например, для билирубина) или только свободной (например, для стероидных гормонов) формы лиганда. Тогда для схемы (1) уравнения закона действующих масс запишутся так:

$$\frac{dm_1}{dt} = -k_1 m_1, \quad m_1(0) = M \quad (6)$$

$$\frac{dm_2}{dt} = k_1 m_1 - \gamma k_{el} m_2, \quad m_2(0) = 0$$

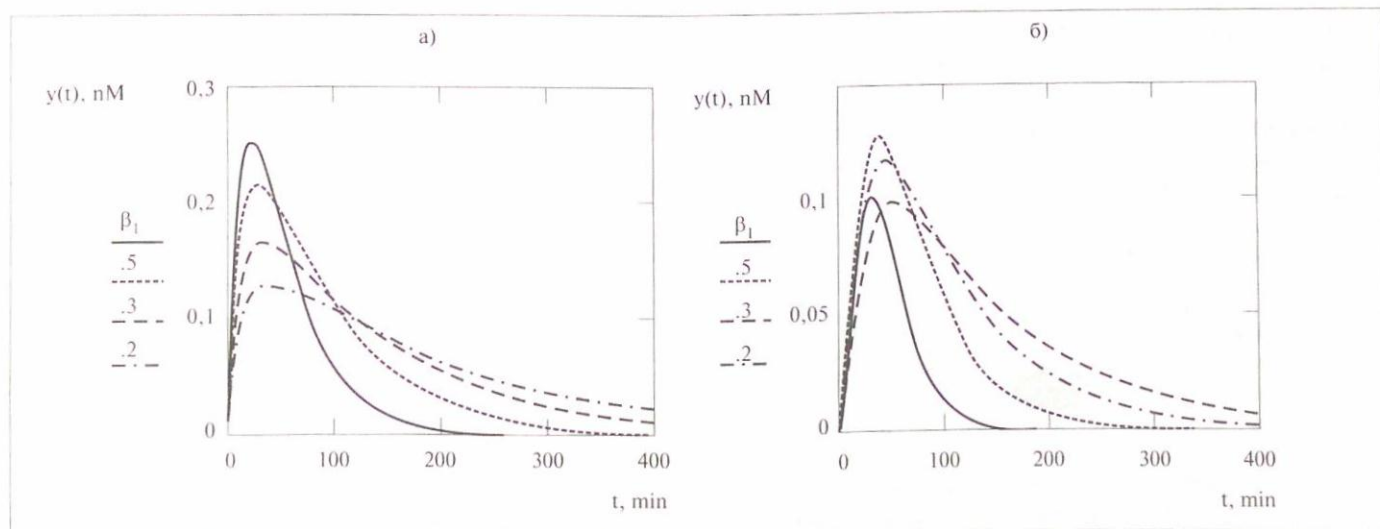
где γ — константа, учитывающая выведение только связанной формы лиганда (в этом случае $\gamma=\beta$, уравнение (5)) или только свободной формы лиганда (тогда $\gamma=\alpha$, уравнение (4)).

Для системы (6) решения записываются так:

$$m_2 = M(e^{-k_{el}t} - e^{-k_1t}). \quad (7)$$

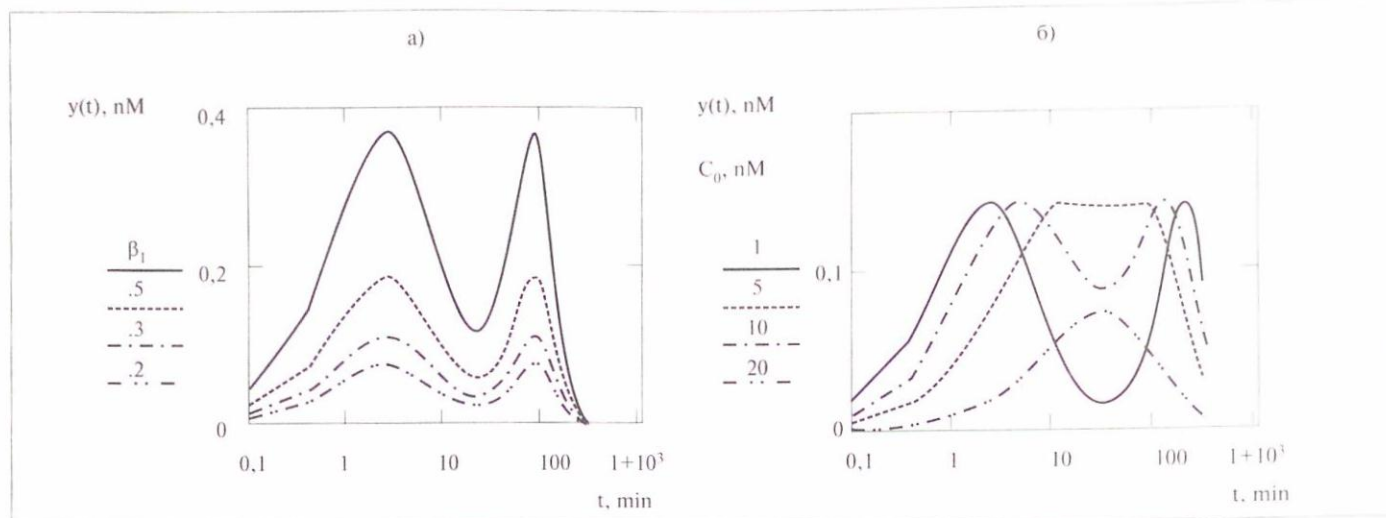
Рис. 2

Развитие биологического ответа во времени



Примечание. z определяется уравнением (12), y — уравнением (11) (а), (11') (б). $k_1 = 0,0277$ мин⁻¹, $k_{el} = 0,0714$ мин⁻¹, $C_0 = 1$ нМ, $A = 1$, $g = b$.

Развитие биологического ответа во времени



Примечание. z определяется уравнением (12), y — уравнением (13). $k_1 = 0,0277 \text{ мин}^{-1}$, $k_{el} = 0,0714 \text{ мин}^{-1}$, $A = 1$, $g = b$. а) $C_0 = 1 \text{ нМ}$, вариация b , б) $b = 0,388$, вариация C_0 .

Однако, с практической точки зрения, удобней использование концентрации, а не массы лиганда. Тогда (7) преобразуется:

$$C(t) = C_0 (e^{-k_{el}t} - e^{-k_1t}),$$

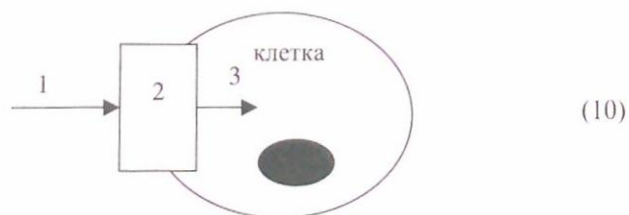
где $C(t) = m(t)/V$ — концентрация лиганда, V — объем камеры (для крови 5 л), C_0 — начальная эффективная концентрация лиганда.

Для того чтобы вызвать биологический ответ, лиганд должен провзаимодействовать с клеточным рецептором. Только свободная форма лиганда может это сделать:



где R — рецептор, LR — лиганд-рецепторный комплекс, K_d — константа диссоциации.

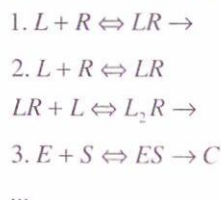
Концентрация лиганд-рецепторных комплексов зависит от соотношения концентраций лиганда и рецептора и модели рецепторного связывания [6]. Но нас интересует не количество связанного лиганда, а конечный клеточный ответ. Формирование этого ответа можно представить схемой:



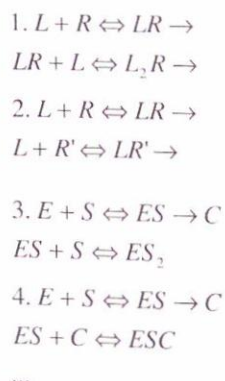
где 1 — поступающий сигнал (свободная концентрация лиганда), 2 — система проведения и усиления рецепторного сигнала, 3 — клеточный ответ.

Чтобы описать конечный клеточный ответ согласно схеме (10), мы провели классификацию основных моделей проведения и усиления сигнала. К схемам первого типа мы отнесли те, для которых характерен выход дозовой кривой на плато; к схемам второго типа — те, для которых на дозовой кривой имеется максимум (схемы с обратной связью).

Кинетические схемы первого типа:



Кинетические схемы второго типа:



где E — фермент, S — субстрат, ES — фермент-субстратный комплекс, C — продукт ферментативной реакции.

Можно показать, что для кинетических схем первого типа (кроме схемы 2) с точностью до первых рядов

Таблица

Бимодальные зависимости доза-эффект

Соединение	Биологический ответ	Объект воздействия	Авторы
<i>Неорганические соединения</i>			
Ионы меди	термостабильность	клетки дуаниеллы	Веселова и соавт., 1993 [10]
	теплоустойчивость	мембраны тилакоиды	Веселовский и соавт., 1999 [11]
Ионы кальция	проницаемость	хлорные каналы	Kuruma, Hartzell, 2000 [12]
Пероксид водорода	повреждающая активность	клеточная линия V79	Kaneko et al., 1994 [13]
	повреждение ДНК	E. coli	Implay, Linn, 1986 [14]
<i>Пептидные органические соединения</i>			
200 токсинов	захват нейтрального красителя	фибробласты	Holzutter, Quedenau, 1995 [15]
Трициклические антидепрессанты	активность моноаминоксидазы	головной мозг, тромбоциты	Reid et al., 1988 [16]
Фенозан, α -токоферол	каталитическая активность	протсинкиназа С	Пальмина и соавт., 1999 [17]
Форболовый эфир	активация	В-клетки	Mond et al., 1991 [18]
Имазалил	рост клеток	семена гороха, водоросль сценелесмус	Веселовский и соавт., 1999 [11]
Органические пероксиды	рост биомассы	клетки культуры табака	Богатыренко и соавт., 1989 [19]
Форсколин	генерация активных форм кислорода	остеокласты	Berger, Datta, 2000 [20]
Простангландин E_2	пролиферация	лимфоциты	Sergeeva et al., 1997 [21]
Никотин	тревога	крысы	File et al., 1998 [22]
Трансформированный ростовой фактор β	секреция инсулина	клеточная линия MIN6	Sekine et al., 1994 [23]
Фактор роста опухолей β	пролиферация	культура гладко-мышечных клеток	Battegay et al., 1990 [24]
β -блокаторы	частота, сила сокращений	культура кардиомиоцитов	Moins et al., 1991 [25]
β -субъединица холерного токсина	рост	культура клеток 3T3	Buckley et al., 1990 [26]
Маленовый ангидрид	цитотоксичность	NK-клетки	Piccoli et al., 1984 [27]
<i>Пептидные соединения</i>			
трансглутаминаза	сродство адренорецепторов к лигандам	нейробластома	Zhang et al., 1999 [28]
нейропептид Y	пищевая мотивация	крыса	Borisova et al., 1991 [29]
опиоидные пептиды	высвобождение энкефалинов	бледное тело	Olive, Maidment, 1998 [30]
	активность аденилатциклазы	myenteric plexus	Wang, Gintzler, 1994 [31]
мет-энкефалин	пролиферация	лимфоциты	Дубинин, 1997 [32]
интерлейкин-1	активность цитохрома P450	гепатоциты	Nikolova-Karakashian et al, 1997 [33]
	стимуляция	b-клетки	Spinass et al., 1988 [34]
ростовой гормон	секреция и клиренс	человек	Veldhuis et al., 1993 [7]
p-формил-метионил-лейцин-фенилаланин	Продукция свободных форм кислорода	нейтрофилы	Bellavite et al., 1993 [35]

разложения в ряд Тейлора клеточный ответ так зависит от поступающего сигнала:

$$y = \frac{Az}{1+z} \quad (11)$$

и для схемы 2

$$y = \frac{Az^2}{1+z^2} \quad (11')$$

где z — поступающий сигнал (например, концентрация лиганда), y — клеточный ответ, A — коэффициент пропорциональности, учитывающий усиление ($A > 1$) или ослабление ($0 < A < 1$) сигнала.

Если изменение концентрации лиганда задается уравнением (8) и только свободный лиганд (уравнение (5)) может вызвать клеточный ответ, то z описывается формулой:

$$z(t) = L(t) = \beta C_0 (e^{-k_{el}t} - e^{-k_1t}). \quad (12)$$

Нами был произведен численный расчет развития клеточного ответа во времени для схем первого типа (рис. 2). Величины k_{el} и k_1 были взяты из работы [7] для гормона роста. Как следует из рисунка, для схем первого типа наблюдается мономодальная дозовая фармакокинетическая зависимость, при этом время наступления максимума эффекта и время развития биологической реакции зависят от степени связывания лиганда с белком-переносчиком. Это действительно было показано в работе [7], в которой изучались эффекты гормона роста и его аналогов при введении людям разных возрастных категорий, при ассоциации с различными белками-переносчиками, использовании разных доз гормона.

Для схем второго типа величину y можно описать уравнением:

$$y = Aze^{-\lambda t} \quad (13)$$

В этом случае фармакокинетическая дозовая зависимость имеет два максимума (бимодальная кривая), при этом величины максимумов и наличие бимодального эффекта зависят от введенной концентрации лиганда и его ассоциации с белками-переносчиками, что соответствует результатам работы (Veldhuis *et al.*, 1993). Незначительные изменения в этих величинах могут привести к драматическому изменению формы кривой ответа (рис. 3).

Обсуждение. Белковые транспортные системы млекопитающих характеризуются гетерогенностью связывающих белков [8]. Соответственно с полученными результатами, в случае бимодальных зависимостей доза-эффект биологический ответ живых систем будет определяться не только дозой биологически активного вещества, как это обычно принято считать в фармакологии, а также и связыванием с белками-переносчиками. Концентрация лиганда и его связывание с транспортными системами определяют не только величину, но и форму биологического ответа, включая межпиковый период на бимодальной дозовой кривой и саму возможность формирования бимодального ответа. Изменение величин этих параметров может привести к драматической трансформации формы фармакокинетической кривой от мономодальной к бимодальной и наоборот.

Данное заключение имеет существенное значение для медицины. Это связано с тем, что достаточно часто в терапевтических целях используются синтетические аналоги гормонов (пероральная контрацепция, гормонзаместительная терапия и т.д.). Эти аналоги имеют другое сродство с транспортными белками крови, чем природные соединения. Таким образом, использование подобных препаратов может привести к извращению биологического ответа не только по величине, но и по форме. Поэтому назначение синтетических аналогов гормонов отнюдь не столь безопасно и безразлично для организма, как это может показаться на первый взгляд.

Кроме того, при многих патологических состояниях изменяется продукция гормонов, что наиболее характерно для новообразований из гормонпродуцирующих тканей. В частности, при поликистозе яичников описано изменение концентрации в крови половых гормонов; белка, связывающего половые гормоны, а также отношения концентраций свободных и связанных половых гормонов [9]. Как следует из наших результатов, это может привести к драматическому изменению биологического ответа на половые гормоны не только по силе, но и по форме.

Поэтому следует соблюдать большую осторожность при испытании новых лекарственных средств, имеющих регуляторные механизмы действия, оценивая не только их фармакокинетический профиль, но и развитие биологического ответа. Такое исследование должно проводиться при достаточно широком диапазоне времен, чтобы быть уверенным в отсутствии (наличии) бимодальной дозовой зависимости. Кроме того, необходимо исследовать широкий диапазон концентраций исследуемого фармакологического препарата, так как увеличение/уменьшение дозировки может привести к изменению биологического ответа. Также обязательно следует исследовать зависимость биологического ответа от концентрации связывающих белков: у лиц разных возрастных категорий, при гипоальбумин- и глобулинемии, новообразованиях и т.д. Без подобных исследований нельзя быть уверенным в отсутствии изменения не только силы, но и формы биологического ответа у различных людей при широком использовании данного препарата.

Для лекарственных веществ, не имеющих регуляторного механизма (антибиотики), изменение дозировки и связывания с белками-переносчиками может повлиять на величину их максимальной концентрации и длительность циркуляции в крови (аналогично данным, приведенным на рис. 2). Несмотря на то, что при применении лекарственных веществ, не имеющих регуляторной природы, не происходит драматических изменений формы биологического ответа, их исследования также должны проводиться достаточно тщательно, учитывая возможные модификации в величине биологического ответа и частоте назначения препарата при изменении дозировки и/или связывании с белками крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галактионов С.Г., Голубович В.П., Шендерович М.Д., Архив А.А. Введение в теорию рецепторов. — Минск: Наука и техника, 1986. — 199 с.
2. Булакова Е.Б. Эффект сверхмалых доз // Вестн. Росс. Акад. наук, 1994, Т. 64, № 5, с. 425-431.
3. Спитковский Д.М. Биологическое действие малых доз ионизирующей радиации // Радиобиология, 1992, т. 32, № 3, с. 382-399.
4. Гуревич К.Г., Шимановский Н.Л. Закономерности действия сверхмалых доз биологически активных веществ // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2000, № 3, с. 45-48.
5. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы физиологически активных веществ. — М.: Волгоград: Семь ветров, 1999. — 637 с.
6. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. Практический курс. — М.: Фаир-пресс, 1999. — 720 с.
7. Veldhuis J.D., Johnson M.L., Faunt L.M., Mercado M., Baumann G. Influence of high affinity growth hormone binding protein on plasma profiles of free and bound GH and on the apparent half-life of GH // J. Clin. Invest., 1993, V. 91, P. 629-641.
8. Barnard R., Wolff R. Analysis and application of an equilibrium model for in vitro bioassay systems with three components: receptor, hormone and hormone-binding protein // J. Theor. Biol., 1998, V. 190, P. 333-339.

9. Hamilton-Fairley D., White D., Griffiths M., Anyaoku V., Koistinen R., Seppala M., Franks S. Diurnal variation of sex hormone binding globulin and insulin-like growth factor binding protein-1 in women with polycystic ovary syndrome // *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1995. V. 43. P. 159-165.
10. Веселова Т.В., Веселовский В.А., Чернавский Д.С. Стресс у растений. — М.: Изд-во МГУ, 1993. — 144 с.
11. Веселовский В.А., Веселова Т.В., Чернавский Д.С. Трехфазная (парадоксальная) дозовая зависимость реакции растительной клетки на факторы внешней среды // *Росс. хим. журн.*, 1999. T. XLIII. № 5, с. 49-54.
12. Kurama A., Hartzell H.C. Bimodal control of a Ca(2+)-activated Cl(-) channel by different Ca(2+) signals // *J. Gen. Physiol.*, 2000. V. 115. N. 1. P. 59-80.
13. Kaneko M., Kodama M., Inoue F. Bimodal pattern of killing of Chinese hamster V79 variant cells by hydrogen peroxide // *Free Radic. Res.*, 1994. V. 20. N. 4. P. 229-239.
14. Imlay J.A., Linn S. Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide // *J. Bacteriol.*, 1986. V. 166. N. 2. P. 519-527.
15. Holzhtuter H.G., Quedenau J. Mathematical modelling of cellular responses to external signals // *J. Biol. Systems*, 1995. V. 3. N. 1. P. 127-138.
16. Reid A.A., Hill J.L., Murphy D.L. Interaction of tricyclic antidepressant drugs with human and rat monoamine oxidase type B. Naunyl Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 1988. 338: 678-683.
17. Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Пыльзрь Е.И., Буракова Е.Б. Модификация активности протеинкиназы С лигандами в сверхмалых концентрациях. Роль протеинкиназы С в процессах перекисного окисления // *Росс. хим. журн.*, 1999. T. XLIII. № 5, с. 55-62.
18. Mond J.J., Feuerstein N., June C.H., Balapure A.K., Glazer R.L., Witherspoon K., Brunswick M. Bimodal effect of phorbol ester on B cell activation. Implication for the role of protein kinase C. // *J. Biol. Chem.*, 1991. V. 266. N. 7. P. 4458-4463.
19. Бозатыренко Т.Н., Редкозубова Г.П., Кондратов А.А., Антоновский В.Л., Буракова Е.Б. Влияние органических пероксидов на рост культивируемых клеток высших растений // *Биофизика*, 1989. T. 34. № 2, с. 327-329.
20. Berger C.E., Datta H.K. Forskolin has a bimodal cAMP-independent effect on superoxide anion generation in isolated osteoclasts // *Exp. Physiol.*, 2000. V. 85. N. 1. P. 57-60.
21. Sergeeva M.G., Gonchar M.V., Mavkh, A.T., Varfolomeev, S.D. Prostaglandin E₂ biphasic control of lymphocyte proliferation: inhibition by picomolar concentration // *FEBS Lett.*, 1997. V. 418. P. 235-238.
22. File S.E., Kenny P.J., Ouagazzal A.M. Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: role of the dorsal hippocampus // *Behav. Neurosci.*, 1998. V. 112. N. 6. P. 1423-1429.
23. Sekine N., Yamashita N., Kojima I., Miyazaki J., Ogata E. Bimodal effect of transforming growth factor-beta on insulin secretion in MIN6 cells // *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 1994. V. 26. N. 1. P. 7-14.
24. Battegay E.J., Raines E.W., Seifert R.A., Bowen-Pope D.F., Ross R. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop // *Cell*, 1990. V. 63. N. 3. P. 515-524.
25. Moins N., Renoux M., Boucher M., Gachon P. Paradoxal pharmacologic effects observed with beta-blocker agents on cardiac cells in culture // *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 1991. V. 27A. N. 2. P. 147-150.
26. Buckley N.E., Matyas G.R., Spiegel S. The bimodal growth response of Swiss 3T3 cells to the B subunit of cholera toxin is independent of the density of its receptor, ganglioside GM1 // *Exp. Cell Res.*, 1990. V. 189. N. 1. P. 13-21.
27. Piccoli M., Saito T., Chirigos M.A. Bimodal effects of MVE-2 on cytotoxic activity of natural killer cell and macrophage tumoricidal activities // *Int. J. Immunopharmacol.*, 1984. V. 6. N. 6. P. 569-576.
28. Zhang J., Tucholski J., Lesort M., Jope R.S., Johnson G.V. Novel bimodal effects of the G-protein tissue transglutaminase on adrenoceptor signalling // *Biochem. J.*, 1999. V. 343. Pt. 3. P. 541-549.
29. Borisova E.V., Kadar T., Telegdy G. Bimodal effect of neuropeptide Y on feeding, and its antagonism by receptor blocking agents in rats // *Acta Physiol. Hung.*, 1991. V. 78. N. 4. P. 301-308.
30. Olive M.F., Maidment N.T. Opioid regulation of pallidal enkephalin release: bimodal effects of locally administered mu and delta opioid agonists in freely moving rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998. V. 285. N. 3. P. 1310-1316.
31. Wang L., Gintzler A.R. Bimodal opioid regulation of cyclic AMP formation: implications for positive and negative coupling of opiate receptors to adenylyl cyclase // *J. Neurochem.*, 1994. V. 63. N. 5. P. 1726-1730.
32. Дубинин К.В. Кинетические закономерности регуляции гуморального и клеточного иммунного ответа опиоидными рецепторами и их лигандами. Автореф. дисс. ... канд. хим. Наук. М., 1997. — 20 с.
33. Nikolova-Karakashian M., Morgan E.T., Alexander C., Liotta D.C., Merrill A.H. Jr. Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1beta. Implications for the regulation of cytochrome p450 2C11 // *J. Biol. Chem.*, 1997. V. 272. N. 30. P. 18718-18724.
34. Spinas G.A., Palmer J.P., Mandrup-Poulsen T., Andersen H., Nielsen J.H., Nerup J. The bimodal effect of interleukin 1 on rat pancreatic beta-cells—stimulation followed by inhibition—depends upon dose, duration of exposure, and ambient glucose concentration // *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, 1988. V. 119. N. 2. P. 307-311.
35. Bellavite P., Chirumbolo S., Lippi G., Guzzo P., Santonastaso C. Homologous priming in chemotactic peptide stimulated neutrophils // *Cell Biochem. Funct.*, 1993. V. 11. P. 93-100.

Популяционная фармакокинетика препарата метотрексат. Клинический мониторинг при лечении острого лимфобластного лейкоза и лимфом у детей

А.С. Сингин

Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва

Успех химиотерапии злокачественных новообразований с применением препаратов, отличающихся узким терапевтическим коридором и высокой токсичностью, во многом зависит от точного выбора режима дозирования. Выбор оптимальных режимов дозирования очень важен для препаратов, у которых зона положительного эффекта расположена в непосредственной близости от зоны риска. В этих случаях применение средних доз препарата может приводить к непредсказуемым последствиям. В связи с выше сказанным оптимальная химиотерапия рака предполагает тщательный подбор режима дозирования для каждого конкретного пациента. К сожалению, подобный подход в химиотерапии рака до настоящего времени не разработан ни в России, ни за рубежом. Одной из главных причин является отсутствие четкого описания соотношения между концентрацией препарата в крови (максимальной концентрацией или площадью под фармакокинетической кривой) и наблюдаемым фармакологическим эффектом и/или токсичностью препарата, то есть ФК/ФД модели, которую можно было бы использовать для индивидуализации. Кроме того, эффект противоопухолевых препаратов проявляется через достаточно длительное время, что в свою очередь затрудняет интерпретацию данных терапевтического лекарственного мониторинга.

Однако, в тех случаях, когда эффект может быть оценен достаточно быстро, например, в антибактериальной терапии, при использовании сердечно-сосудистых и психотропных препаратов клинический мониторинг проводится достаточно успешно. Это стало возможным благодаря появлению новых подходов к моделированию фармакокинетических процессов, протекающих в организме человека, и методов количественного анализа ФК/ФД данных, содержащих крайне ограниченное число измерений у каждого пациента. В результате этих подходов в Южно-Калифорнийском Университете профессором Джеллиффом и сотрудниками его лаборатории был разработан пакет программ USC*PACK. В состав пакета входят программы для параметрического (IT2B) и непараметрического (NPEM) популяционного моделирования, которые на основании результатов ФК/ФД исследований позволяют рассчитать совместные и маргинальные плотности вероятности распределения (joint and marginal probability density functions) значений параметров выбранной модели, а также их статистические характеристики (среднее значение, медиану, квантили, асимметрию и эксцесс, показатели дисперсии, коэффициенты вариации и др.).

Полученные популяционные распределения параметров ФК модели лекарственного препарата и их статистические моменты могут быть введены в программу

моделирования на основе байесовского подхода (MB программа), имеющуюся в составе пакета USC*PACK, и использованы для расчета индивидуальных значений ФК параметров и планирования индивидуальных режимов дозирования пациента. В дальнейшем, назначенная терапия может корректироваться по мере получения новых данных у этого пациента. Это особенно важно для пациентов, у которых наблюдается быстрое изменение массы тела или неустойчивая функция почек. Применяемый метод оценки клиренса креатинина позволяет учитывать возможную нестабильность клиренса креатинина у каждого пациента, что особенно важно для оптимизации дозирования таких препаратов, как метотрексат, преимущественно выводимых почечным путем.

Кроме того, такие вероятностные распределения позволяют выявить в исследуемой популяции пациентов подгруппы, значительно отличающиеся по значениям ФК и ФД параметров. Идентификация индивидуальных значений ФК параметров конкретного пациента после предварительного введения заведомо нетоксичной дозы и определения 1-2 концентраций препарата в сыворотке крови позволяет определить, к какой субпопуляции может быть отнесен пациент. В этот момент могут быть обнаружены, например, так называемые «медленные» и «быстрые» метаболизеры.

В отличие от традиционно применяемых методов,

расчеты с помощью программы USC*PACK для определения оптимального режима дозирования не требуют выполнения обязательного условия достижения стационарного равновесия распределения препарата к моменту взятия проб крови. Это позволяет проводить измерения концентрации препарата на самых ранних этапах терапии, учитывать реальные колебания концентрации препарата в интервале дозирования при дозировании неравными дозами через неравные промежутки времени.

На основе имеющихся данных ТЛМ пациента программа рассчитывает индивидуальные кривые изменения концентрации препарата во времени и соответствующие им величины площади под фармакокинетической кривой (AUC), которые можно соотнести с данными об индивидуальной ФД (эффект, токсичность). Это позволяет выбрать индивидуальную терапевтическую цель, чтобы избежать чрезмерную токсичность и повысить эффективность проводимой терапии. Таким образом, происходит переход от концепции «средних терапевтических доз и режимов дозирования» к индивидуализации терапии на основе ФК/ФД моделирования.

В настоящем исследовании была предпринята попытка применения методов популяционной фармакокинетики для описания фармакокинетических процессов и сопутствующих им фармакодинамических показателей препарата метотрексат, широко применяющегося при лечении острого лимфобластного лейкоза и злокачественных лимфом у детей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фармакокинетические исследования метотрексата в клинике были проведены у 25 пациентов в режиме 24-часовой (лимфомы) или 36-часовой (острый лимфобластный лейкоз) инфузии.

Концентрация препарата в сыворотке крови определялась хроматографически.

Расчет фармакокинетических параметров линейной двухкамерной модели, выбранной для описания поведения метотрексата в организме, их статистическая обработка осуществлялись с применением программы USC*PACK.

В настоящем исследовании для получения средних популяционных и индивидуальных значений фармакокинетических параметров применялась программа NPEM (Nonparametric Expectation Maximization), входящая в состав пакета программ USC*PACK. Эта программа на основании имеющихся данных о концентрации препарата (хотя бы 1-2 измерения у пациента в любые, но лучше, в так называемые, «оптимальные» моменты времени), используя алгоритм максимального правдоподобия и байесовский подход, рассчитывает фармакокинетические параметры для каждого пациента изучаемой популяции и оценивает популяционные плотности распределения вероятностей этих пара-

метров для совокупности всех включенных в исследование пациентов. Таким образом создается популяционная ФК/ФД модель для препарата.

В программе USC*PACK критерием качества приближения в процедуре идентификации индивидуальных фармакокинетических параметров конкретного пациента по имеющимся измерениям концентрации препарата у него в крови является Байесовская объективная функция (Bayesian Objective Function – BOF), рассчитываемая по формуле:

$$BOF = \sum_{i=1}^n \frac{(C_{obs} - C_{mod})^2}{SD_{C_{obs}}^2} + \sum_{j=1}^m \frac{(P_{pop} - P_{mod})^2}{SD_{P_{pop}}^2},$$

где

C_{obs} – измеренные значения концентрации препарата,

C_{mod} – концентрация препарата, рассчитанная по модели,

SD – стандартное отклонение,

P_{pop} – популяционные значения параметров модели,

P_{mod} – индивидуальные значения параметров модели,

n – число имеющихся измерений, m – число идентифицируемых параметров модели.

Выбранная для описания фармакокинетики метотрексата модель включает следующие параметры:

VFC – кажущийся объем распределения центральной камеры в литрах/кг массы тела пациента,

K_{cr} , K_{pc} – константы скоростей обмена между центральной и периферической камерами, $ч^{-1}$,

Kel – константа скорости выведения препарата из кровяного русла, $ч^{-1}$, рассчитываемая по уравнению: $Kel = K_{inter} + K_{slope} \times CCr$, где

K_{slope} – дескриптор, связывающий скорость выведения почечным путем и клиренс креатинина CCr , [$ч \cdot ед. CCr$] $^{-1}$,

K_{inter} – константа скорости выведения препарата непочечными путями, $ч^{-1}$.

Программа также рассчитывает следующие фармакокинетические параметры:

$T_{1/2\alpha}$ – период полураспределения препарата по органам и тканям, $ч$,

$T_{1/2\beta}$ – период полувыведения препарата, $ч$,

AUC_c – площадь под фармакокинетической кривой в центральной камере, $мкг \cdot ч / мл$,

AUC_p – площадь под фармакокинетической кривой в периферической камере, $мкг \cdot ч / кг$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Индивидуальные фармакокинетические параметры для каждого пациента были рассчитаны методом непараметрического моделирования с применением алгоритма максимального правдоподобия. Полученные значения характеризуются значительной (более 35%) межиндивидуальной вариабельностью.

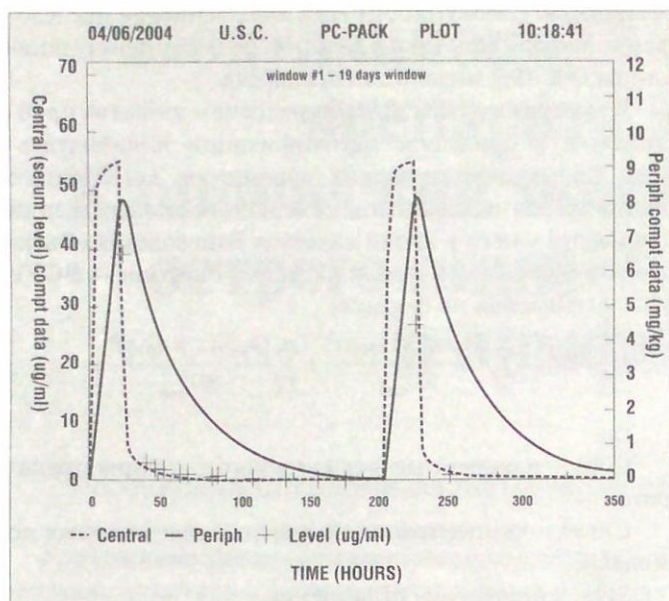


Рис. 1. Индивидуальные фармакокинетические кривые изменения концентрации метотрексата в сыворотке крови пациента №2 (пунктирная — центральная камера, сплошная — периферическая камера), полученные с применением моделирования на основе байесовского подхода. Крестиками обозначены реально определенные в ходе ТЛМ концентрации метотрексата в сыворотке крови.

Рисунок 1 демонстрирует индивидуальные фармакокинетические кривые пациента №2 (два курса терапии, 24-часовая инфузия), рассчитанные программой USC*PACK по 14 имеющимся измерениям концентрации метотрексата в крови этого пациента. Видно, что на основе выбранной двухкамерной модели и полученных популяционных значений ее параметров удается достаточно точно описать имеющиеся измерения концентрации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bischoff K.B., Dedrick R.L., Zaharko D.S., et al «Methotrexate pharmacokinetics» // J Pharm Sci 60: 1128-1133, 1971.
2. Huffman D.H., et al «Pharmacokinetics of methotrexate» // Clin Pharmacol Ther 1973, 14: 572.
3. Jelliffe RW, Schumitzky A, and Van Guilder M. User Manual for Version 10.7 of the USC*PACK Collection of PC Programs. USC, 1996.
4. Lutz R.J., Dedrick R.L., et al «The kinetics of methotrexate distribution in spontaneous canine lymphosarcoma» // J Pharmacokin Biopharm 3: 77-97, 1975.
5. Pratt CB, et al «Response, toxicity and pharmacokinetics of high-dose methotrexate (NSC-740) with citrovorum factor (NSC-3500) rescue for children with osteosarcoma and other malignant tumors» // Cancer Chemother Rep 6:13-18, 1975.
6. Stoller RG, et al «Pharmacokinetics of high-dose methotrexate (NSC-740)» // Cancer Chemother Rep 6:19-24, 1975.
7. Zaharko D.S., Dedrick R.L., Bischoff K.B., et al «Methotrexate tissue distribution: Prediction by a mathematical model» // J Natl Cancer Inst 46: 775-784, 1971.

Особый случай — пациент №12, у которого значение кажущегося объема распределения было значительно (в 2,5 раза) меньше соответствующего среднего значения, а скорость выведения препарата была ниже среднего популяционного значения. Вследствие этих индивидуальных фармакокинетических особенностей, на 48 ч с момента начала инфузии концентрация метотрексата составляла 2,20 мкМ/л, в то время как безопасная концентрация к этому моменту времени должна составлять 0,02 мкМ/л. Для предотвращения необратимой токсичности этому пациенту вводилась соответствующая доза лейковорина (антидот), из расчета 30 мг/м² каждые 6 ч в течение первых суток, затем определялась концентрация метотрексата на 72 ч, которая составила всего 0,05 мкМ/л. Далее лейковорин вводился в дозе 15 мг/м² также каждые 6 ч еще в течение суток.

На протяжении последних 7 лет нами осуществлен клинический мониторинг метотрексата примерно у 1000 пациентов. Анализ полученных результатов показывает, что у 20% пациентов наблюдаются аномально высокие концентрации препарата, из них у 6% — чрезвычайно высокие (1,5-2,5 мкМ/л). Вследствие этого, основной вывод заключается в том, что лечение острого лимфобластного лейкоза и лимфом у детей должно проводиться только под тщательным контролем ТЛМ, поскольку группа риска достаточно велика и составляет около 20%.

Современные методы хроматографического анализа метотрексата и его метаболита — 7-гидроксиметотрексата в сыворотке крови, ТЛМ с последующим применением популяционного моделирования: непараметрического метода максимального правдоподобия и байесовского подхода, реализованных в виде программ (п/п USC*PACK) для анализа ФК данных, позволяют проводить лечение индивидуально и повысить его безопасность.

Рациональное дозирование лекарственных средств: история, настоящее, перспективы

И.И. Мирошниченко, Е.В. Горикова

Научный центр психического здоровья РАМН, г. Москва

В своей каждодневной практике врачу приходится сталкиваться с весьма нетривиальными задачами оптимизации лекарственной терапии: сколько (доза) и как часто (интервал дозирования) назначать лекарственное средство. Для выбора оптимального решения применяются, главным образом, эмпирические и кинетические подходы.

При эмпирическом подходе, врач, основываясь на собственном практическом опыте, устанавливает эффективность препарата при данной патологии и затем подбирает схему дозирования. В целом ряде случаев этот метод вполне приемлем и при достаточно большом числе клинических наблюдений позволяет достичь существенных результатов. Главным недостатком подобного подхода является известный субъективизм в оценках, к тому же для целого ряда лекарственных веществ цена ошибки может быть слишком высока. При эмпирическом (так называемом «наивном») подходе к дозированию доза может быть снижена при токсических проявлениях. В то же время неэффективность терапии выявить достаточно трудно. Более того, снижение дозы при токсическом эффекте может оказаться запоздалым.

Кинетический подход основан на допущении, что величина терапевтического, а также токсического эффекта, зависит от дозы, и, гораздо в большей степени, от концентрации препарата в крови. Для большинства лекарственных веществ удалось показать, что в терапевтически значимом диапазоне концентраций, эффект пропорционален концентрации или ее логарифму (Мирошниченко, 2002).

Для дальнейших рассуждений необходимо рассмотреть терапевтические уровни лекарственных веществ. Следует отметить, что терапевтический эффект наступает при достижении в организме некоторой, минимальной эффективной концентрации (МЭК). В дальнейшем, с повышением концентрации, в общем случае, величина эффекта будет также расти. К сожалению, большинство лекарственных препаратов не являются «терапевтически чистыми» и вызывают нежелательное побочное действие или, другими словами, токсические эффекты. При некоторой максимальной терапевтической или, иначе, минимальной токсической концентрации (МТК) эти эффекты становятся нежелательными и, следовательно, недопустимыми. Диапазон концентраций между МЭК и МТК и является желательным терапевтическим коридором препарата

(Levy, 1998). Использование подхода терапевтических границ во многих случаях помогает в выборе оптимальной схемы дозирования лекарственных веществ.

Во второй половине прошлого столетия было опубликовано огромное количество работ посвященных определению терапевтических и токсических интервалов концентраций самых разнообразных лекарственных средств. Этому обстоятельству в немалой мере способствовал существенный прогресс в разработке методов анализа следовых количеств лекарственных веществ в биологических образцах. В 50-х годах в практику биологических исследований была внедрена газовая хроматография, а в 60-70-х годах высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В дальнейшем прогресс в ВЭЖХ связан с внедрением специфических чувствительных флуоресцентного и электрохимического детекторов.

Необходимо отметить, что границы терапевтического диапазона носят вероятностный характер и могут существенно различаться у отдельных индивидуумов. Имеется масса свидетельств, что у ряда пациентов положительный эффект достигался и при концентрациях в крови меньших, чем нижняя граница терапевтического диапазона. Известны также случаи, когда для достижения терапевтического эффекта некоторым пациентам требовалась концентрация в крови, значительно превышающая верхнюю границу терапевтического диапазона. Подобная картина наблюдалась и в отношении проявления токсических эффектов. В различных работах описывались случаи выявления нежелательных эффектов в пределах терапевтического диапазона.

Все вышесказанное привело к пониманию необходимости проведения терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) и индивидуализации дозирования, а терапевтические рамки при этом рассматривались только как общие рекомендации для поиска оптимального режима дозирования для каждого конкретного пациента. Эту точку зрения наиболее экспрессивно выразил Cipolle (1986): «Drugs don't have doses, people have doses» (Лекарства не имеют доз, люди получают дозы).

Полагают, что необходимость проведения ТЛМ обусловлена следующими основными причинами:

- высокой межиндивидуальной вариацией фармакокинетических параметров препарата, приводящей к существенным различиям уровня стационарных концентраций препарата в крови;
- выявленным соотношением между дозой и уровнем препарата в крови в пределах терапевтических концентраций с одной стороны и фармакологическим (или токсическим) эффектом препарата с другой;
- малой шириной терапевтического коридора лекарственного средства — зона положительного эффекта находится достаточно близко от зоны побочных эффектов.

Среди обстоятельств, затрудняющих проведение ТЛМ, следует отметить трудно поддающуюся оценке внутрииндивидуальную (т.е. колебания стационарной концентрации препарата у одного и того же индивидуума) вариабельность, а также отсутствие во многих случаях адекватного аналитического метода.

Для целого ряда лекарственных препаратов (многих антибиотиков, антиаритмиков, антиконвульсантов, психотропных препаратов, циклоспоринов и др.) было показано существенное повышение эффективности лекарственной терапии на фоне сопутствующего ТЛМ. Проведение мониторинга повысило количество пациентов, получающих адекватную терапевтическим границам дозу препарата. Особенно много работ посвящено мониторингу концентрации антибиотиков группы аминогликозидов (гентамицин, канамицин, ванкомицин и др.) Аминогликозиды характеризуются узким терапевтическим коридором и опасностью токсических эффектов, связанных, в большой степени, с нефро- и ототоксичностью. В связи с этим, опасность, как передозировки с одной стороны, так и неэффективности терапии с другой, выходят на первый план (Campbell et al., 1999).

Тем не менее, в конце 80-х годов появились сомнения в эффективности проведения ТЛМ. Появился ряд публикаций, посвященных взаимосвязи ТЛМ с одной стороны, и исхода и продолжительности терапии с другой. В целом ряде случаев положительного эффекта проведения ТЛМ выявлено не было (Spector et al., 1988). Эти посылки, наряду с достаточно высокой стоимостью аналитического оборудования, привели к изрядной доле скепсиса среди врачей и организаторов здравоохранения в отношении ТЛМ. Независимый аудит выявил, что данные, полученные в результате мониторинга, имеют низкую прогностическую ценность, ввиду их скудности и отсутствия надлежащего статистического инструмента для обработки результатов. ТЛМ обычно предполагает наличие не более 2 — 3 замеров уровня препарата у каждого пациента. Иными словами наблюдалась картина, кратко выраженная следующей фразой: «garbage in, garbage out — что посеешь, то и пожнешь» (Aarons, 1991).

Вышеуказанные трудности в значительной мере в настоящий момент преодолены, в связи с введением в фармакокинетическую практику популяционных методов анализа рассеянных данных и повышением чувствительности и воспроизводимости аналитических методов.

Популяционный подход к изучению фармакокинетики обычно предполагает анализ скудных данных концентрации препарата (от одной до трех величин у индивидуума), собранных у большого количества пациентов в реальных клинических условиях т.е. так называемой целевой популяции. В рамках такого подхода разработаны такие специальные статистические пакеты для обработки данных, как NONMEM (Sheiner, Beal, 1982), название, которого стало в последнее время чуть ли не синонимом популяционной фармакокинетики.

Одновременно произошло внедрение в аналитическую практику таких высокочувствительных и надежных методов определения микроконцентраций лекарственных веществ, как иммуноэссы и хроматомасс-спектрометрия.

Рассмотрим более детально стратегии, применяемые для индивидуализации дозирования, которые могут быть подразделены на 3 категории:

1. априорные подходы, основанные на использовании характеристик пациента, при отсутствии данных о концентрации препарата в крови;
2. метод тестовой дозы — получение данных о концентрации препарата после приема пациентом умеренной пробной дозы перед началом терапии;
3. апостериорные подходы, основанные на измерении стационарной концентрации в крови после продолжительной непрерывной инфузии или неоднократного приема болюсных форм препарата. В дальнейшем, полученная в эксперименте информация, а также характеристики пациента, используются для коррекции дозы. При этом применяются номограммы, многофакторная линейная регрессия и Байесовская оценка.

Априорные методы индивидуализации дозирования используют морфологические, биологические и физиологические характеристики конкретного пациента, такие как вес, возраст, пол, рост, уровень сывороточного креатинина, скорость гломерулярной фильтрации (GFR) и т.п. К примерам априорного подхода можно отнести формулу Calvert et al. (1989) для дозы карбоплатина, которая необходима для достижения желательного значения AUC (3–8 мг*мин/мл):

$$D = AUC \cdot (GFR + 25),$$

при этом величина (GFR+25) в мл/мин в первом приближении равняется значению общего клиренса карбоплатина.

Представляет также интерес валидизированная формула для расчета величины общего клиренса карбоплатина в мл/мин в зависимости от концентрации

креатинина в сыворотке крови в mM (Chatelut et al., 1995):

$$CL \text{ (мл/мин)} = 0,134 \cdot W + [218 \cdot W(1-0,00457 \cdot A)] / C_{cr}$$

(W – вес в кг, A – возраст в годах, и G = 0 для мужчин и 1 для женщин).

Априорные методы достаточно просты для разработки и, в какой-то мере, могут учитывать межличностные различия. Главным их недостатком является низкая точность: как правило, стандартное отклонение и точность априорных методов не менее чем 10 и 20%, соответственно (Rousseau, Marquet, 2002). Дальнейший прогресс в этом направлении связывают с мета-анализом – статистическим методом, позволяющим объединить результаты независимых фармакокинетических исследований. Мета-анализ предполагает изучение всех исследований, посвященных проблеме адекватного дозирования соответствующего препарата, оценку неоднородности и определение информативности основных результатов (Davies, Crombie, 1999).

Метод тестовой дозы включает в себя 2 этапа:

- расчет соответствующих фармакокинетических параметров после приема тестовой однократной дозы и многократного отбора проб;
- вычисление на основании полученных результатов дозы лекарственного вещества, необходимой для достижения поставленных терапевтических целей.

Основной недостаток – при отборе многочисленных образцов крови у пациента необходимо его согласие. Кроме того, врачебная помощь на время исследования откладывается.

Перейдем теперь к рассмотрению апостериорных методов. Для упрощения решения типовых многомерных задач без вычислительных средств до сих пор используются специальные графики – номограммы. Несмотря на низкую точность и некую архаичность, они находят достаточно широкое применение для наглядного расчета доз без использования вычислительной техники.

Характерным примером использования номограмм для индивидуализации дозирования является использование так называемых «Хартфордских» номограмм (Hartford nomograms). Подобные номограммы применяются для расчета интервала дозирования внутривенной инфузии аминогликозидов (Finnell et al., 1998; Triggs, Charles, 1999).

Для нахождения связи между дозой (концентрацией) и параметрами фармакокинетики используются традиционные статистические методы анализа данных, в частности многофакторная линейная регрессия. При расчете находят, например, множественную линейную зависимость между параметром (главным образом AUC) и значениями концентрации препарата, измеренными в строго фиксированные промежутки времени:

$$AUC = A_0 + A_1 C_{t1} + A_2 C_{t2} + A_3 C_{t3} + \dots$$

где A_i – эмпирические константы, а C_{ti} – концентрации препарата в определенные промежутки времени.

Примерами такого метода расчетов могут служить оптимизация дозирования хинидина при аритмии у детей (Burckart, Marin-Garcia, 1986), а также некоторых противоопухолевых средств (Rousseau, Marquet, 2002).

Байесовский подход основан на так называемом Байесовском алгоритме максимизации апостериорной вероятности – maximum a posteriori probability (MAP). Для реализации подобного подхода требуется адекватная популяционная фармакокинетическая модель и при этом оказывается достаточно даже небольшого количества данных о концентрации препарата в крови каждого пациента. Физиологические и биологические характеристики пациентов также принимаются во внимание.

В не столь уж давнем прошлом часто применялся стандартный двухэтапный метод. На первом этапе определяют индивидуальные параметры каждого субъекта, используя методы нелинейной регрессии или оценки максимального правдоподобия (maximum likelihood estimation, MLE). На втором этапе оцениваются средние и дисперсии идентифицированных параметров для популяции, а также в случае глобального двухэтапного параметрического метода корреляции и ковариации между параметрами. Двухэтапный метод достаточно прост в исполнении и обсуждении результатов, но требует больших затрат времени, большого количества образцов, а также приводит к переоценке межличностных различий. В силу этого, по нашему мнению, следует предпочесть одноэтапный метод.

Одноэтапный метод следует рассматривать как истинно популяционный метод: данные, полученные от большого количества пациентов, инкорпорируются в целостную выборку. Значения концентрации в дискретные интервалы времени у различных пациентов объединяются и подвергаются соответствующему программному анализу, хотя количество проб отборов у отдельного индивидуума может быть равным единице. Наиболее распространенным методом при одноэтапном подходе следует признать нелинейную модель смешанных эффектов (non-linear mixed-effect model). Это параметрический метод: подразумевается, что распределение фармакокинетических параметров или же их логарифмов носит нормальный характер. При этом межличностная вариабельность может быть частично объяснена влиянием на фармакокинетику таких демографических и физиологических факторов (ковариат), как пол, возраст, раса, курение, состояние почечной и печеночной функции и т.д. Модель, потому и носит название модель смешанных эффектов, что учитываются как фиксированные воздействия (дозы, ковариаты, популяционные параметры), так и случайные величины (интраиндивидуальная изменчивость,

и, так называемая, «необъяснимая» часть межиндивидуальных различий). Как указывалось ранее, наиболее мощной и популярной компьютерной программой для моделирования смешанных эффектов является NONMEM. Следует также упомянуть программу SIPHAR, использующую нелинейную регрессию (Cockshott, Haywood, 1992).

В популяционном моделировании применяется и непараметрический подход, который не предполагает конкретную форму распределения кинетических параметров. В программе NPEM — (непараметрический метод максимизации вероятности, the nonparametric expectation maximization algorithm) используется Байесовский подход. При этом методом итераций строится непрерывная совместная плотность распределения фармакокинетических параметров, что позволяет выделять субпопуляции больных. В качестве программного обеспечения предлагается USC*PACK в состав которого входит NPEM (Jelliffe et al., 1998). Хорошим примером использования программы NPEM в отечественной практике является оптимизация дозирования антиконвульсантов (Гусев и др., 2000).

В настоящее время наблюдается устойчивый интерес к генетически обусловленным факторам риска и вариабельности терапевтического эффекта. В перспективе генотипирование пациентов приведет к снижению количества наследственных заболеваний и оптимизации терапии путем выявления генетического по-

лиморфизма изоферментов цитохрома P-450 (Dahl, 2002). Снижение лебризохин гидроксилазной активности обусловлено изменением активности CYP2D6. Индоевропейская популяция насчитывает от 7 до 10% лиц с дефицитом данного фермента. Большое количество препаратов (b-адреноблокаторы, антиаритмики, трициклические антидепрессанты, нейролептики) являются субстратами CYP2D6, и наблюдаемое 10–20 кратное различие в метаболизме этих веществ у человека также объясняется полиморфизмом. Обнаружен также полиморфизм стереоселективного гидроксилирования S-мефенитоина. Дефицит CYP2C наблюдается у 2–5% европейцев, 18–23% японцев и у 5–17% китайцев (Meyer, Rodvold, 1996). Необходимо также учитывать генетически обусловленную разницу в экспрессии Р-гликопротеинов (Kigata et al., 2002).

В заключение следует отметить, что генотипирование позволит учесть при подборе режимов дозирования значительную долю имеющихся межиндивидуальных расхождений. Тем не менее, непредвиденные реакции пациента на препарат, клиническая нестабильность, а также лекарственное взаимодействие, позволяют сделать прогноз, что применение ТЛМ и, в дальнейшем, будет оставаться мощным средством повышения эффективности терапии. Дальнейший прогресс в мониторинге связывают с разработкой микрометодов, позволяющих получать достаточную информацию при исследовании небольших (<100 мкл) образцов плазмы крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев Е.И., Белоусов Ю.Б., Гехт А.Б., Бондарева И.Б., Соколов А.В., Тищенко И.Ф. Лечение эпилепсии: рациональное дозирование антиконвульсантов. // С.-Петербург: «Речь» — 2000. — 202С.
2. Мирошницкий И.И. Основы фармакокинетики. // М: ГЭОТАР-МЕД — 2002. — 192С.
3. Aaronson L. Population pharmacokinetics: theory and practice. // Br. J. Clin. Pharmacol. — 1991. — Vol. 32. — P.669–670.
4. Burckart G.J., Marin-Garcia J. Quinidine dosage in children using population estimates. // Pediatr. Cardiol. — 1986. — Vol. 6, No. 5. — P.269–273.
5. Calvert A.H., Newell D.R., Gumbrell L.A., O'Reilly S., Burnell M., Boxall F.E., Siddik Z.H., Judson I.R., Gore M.E., Wiltshaw E. Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function. // J. Clin. Oncol. — 1989. — Vol. 7, No. 11. — P.1748–1756.
6. Campbell D., Thomson A.H., Stack B. Population pharmacokinetics of aminoglycoside antibiotics in patients with cystic fibrosis. // Ther. Drug Monit. — 1999. — Vol. 21. — P.281–288.
7. Chatelet E., Canal P., Brunner V., Chevreau C., Pujol A., Boneu A., Roche H., Houin G., Bugat R. Prediction of carboplatin clearance from standard morphological and biological patient characteristics. // J. Natl. Cancer Inst. — 1995. — Vol. 87, No. 8. — P.573–580.
8. Cipolle R.J. Drugs don't have doses—people have doses! A clinical educator's philosophy. // Drug Intelligence & Clinical Pharmacy — 1986. Vol. 20. — P.881–882.
9. Cockshott I.D., Haywood J. Extended least squares curve fitting: a comparison of SIPHAR and MKMODEL. // Biopharm. Drug Dispos. — 1992. — Vol. 13, No. 6. — P.461–480.
10. Dahl M.-L. Cytochrome P450 phenotyping in patients receiving antipsychotics. Useful aid to prescribing? // Clin. Pharmacokinet. — 2002. Vol. 41. — P.453–470.
11. Davies H., Crombie I. Что такое мета-анализ? // Клин. Фармакол. Терапия — 1999. — Т.8, № 6. — С. 52–56.
12. Finnell D.L., Davis G.A., Cropp C.D., Ensom M.H. Validation of the Hartford nomogram in trauma surgery patients. // Ann. Pharmacother. — 1998. — Vol. 32, No. 4. — P.417–421.
13. Jelliffe R.W., Schumitzky A., Bayard D., Milman M., Van Guilder M., Wang X., Jiang T., Barbaut X., Maire P. Model based, goal-oriented, individualised drug therapy. Linkage of population modelling, new 'multiple model' dosage design, bayesian feedback and individualised target goals. // Clin. Pharmacokinet. — 1998. — Vol. 34, No. 1. — P.57–77.
14. Kurata Y., Ieiri I., Kimura M., Morita T., Irie S., Urae A., Ohdo S., Ohtani H., Sawada Y., Higuchi S., Orsato K. Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. // Clin. Pharmacol. Ther. — 2002. — Vol. 72. — P.209–219.
15. Levy G. What are narrow therapeutic index drugs? // Clin. Pharmacol. Ther. — 1998. — Vol. 63, No. 5. — P.501–505.
16. Meyer J.M., Rodvold K.A. Drug biotransformation by the cytochrome P-450 enzyme system. // Infect. Med. — 1996. — Vol. 13, No. 6. — P.452, 459, 463–464, 523.
17. Rousseau A., Marquet P. Application of pharmacokinetic modelling to the routine therapeutic drug monitoring of anticancer drugs. // Fund. & Clin. Pharmacol. — 2002. — Vol. 16. — P.253–262.
18. Sheiner L.B., Beal S.L. Bayesian individualisation of pharmacokinetics: simple implementation and comparison with non-Bayesian methods. // J. Pharm. Sci. — 1982. — Vol. 71. — P.1344–1348.
19. Spector R., Park G.D., Johnson G.F., Vesell E.S. Therapeutic drug monitoring. // Clin. Pharmacol. & Ther. — 1988. — Vol. 43. — P.345–353.
20. Triggs E., Charles B. Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of gentamicin in the elderly. // Clin. Pharmacokinet. — 1999. — Vol. 37, No. 4. — P. 331–341.

Терапевтический лекарственный мониторинг противовирусных препаратов

Ю.Б. Белоусов¹, К.Г. Гуревич², Г.И. Сторожаков³

¹ — кафедра клинической фармакологии и фармакокинетики РГМУ, г. Москва

² — кафедра ЮНЕСКО при МГМСУ «Здоровый образ жизни — залог успешного развития», г. Москва

³ — кафедра госпитальной терапии №1 РГМУ, г. Москва

Терапевтический лекарственный мониторинг основан на определении концентрации лекарственного вещества, его метаболитов или других биологически активных веществ в плазме крови или других тканях организма. Он проводится для контроля за проводимой фармакологической терапией с тем, чтобы концентрация препарата не превысила минимальную токсическую и не была ниже минимальной терапевтической. Терапевтический лекарственный мониторинг обычно проводится при неэффективности фармакотерапии, наличии лекарственных взаимодействий, применении лекарственных средств с узким терапевтическим диапазоном, у лиц с сопутствующими заболеваниями печени и почек, пожилых, детей, пациентов, получающих более 3-5 препаратов.

При проведении терапевтического лекарственного мониторинга обычно предполагается, что концентрация препарата или его активного метаболита в плазме крови пропорциональна вызываемому эффекту. Для токсических эффектов лекарственных средств, связанных с передозировкой, также верно предположение о четкой связи концентрации препарата или его метаболитов в плазме крови с вызываемым откликом организма.

Противовирусные препараты (интерфероны, ингибиторы вирусной ревертазы, антитела) нашли широкое применение в клинике для лечения ВИЧ, гепатита В и др. вирусных заболеваний. Препараты данной группы обладают различной специфичностью по отношению к разным вирусам. Их терапевтическое действие проявляется в узком диапазоне концентраций: превышение этих концентраций приводит к развитию токсических эффектов, более низкие концентрации приводят к неэффективности проводимой терапии. Так, при превышении диапазона терапевтических концентраций для ацикловира, что может быть связано как с почечной недостаточностью, так и с индивидуальными особенностями метаболизма/распределения препарата, наблюдаются нейротоксические эффекты [1]. Для ингибиторов вирусной ревертазы доказано наличие четкой связи между концентрацией препарата в крови и вызываемым им эффектом (терапевтический, токсический или отсутствие эффекта) [2]. Поэтому для оптимизации фармакотерапии противовирусных препаратов необходим терапевтический лекарственный мониторинг, позволяющий индивидуально подобрать дозы и режимы введения лекарственных средств данной группы.

В ситуациях, когда необходим терапевтический лекарственный мониторинг противовирусных препара-

тов, с нашей точки зрения, в первую очередь относятся:

1. Значительная индивидуальная вариация фармакокинетических параметров препаратов. Например, подобная ситуация наблюдается для ацикловира [3].
2. У детей и лиц пожилого возраста. У первых имеются существенные вариации в развитии систем метаболизма и экскреции лекарственных веществ. Практически у всех лиц пожилого возраста имеются заболевания, которые могут изменить фармакокинетические параметры известных лекарственных препаратов или потребовать комплексной терапии, при которой могут возникнуть непредсказуемые лекарственные взаимодействия. Кроме того, с возрастом даже у лиц без заболеваний почек отмечается снижение почечного клиренса креатинина, что характеризует снижение эффективности системы элиминации лекарственных средств.
3. При узком терапевтическом диапазоне лекарственного препарата, что характерно для всех известных в настоящее время противовирусных средств; при высокой вероятности развития побочных эффектов даже при использовании ми-

нимальных терапевтических концентраций лекарственного вещества.

4. При беременности, лактации и др. ситуациях, когда необходимо полностью исключить риск развития побочных эффектов лекарственной терапии или же существенно изменяются фармакокинетические параметры препаратов.
5. При нелинейной фармакокинетики препарата, когда нет четкой связи между концентрацией препарата в крови и терапевтическим эффектом. При этом обычно постулируется, что развитие побочных эффектов связано с изменением концентрации препарата в плазме крови или эффекторной ткани.
6. При заболеваниях, изменяющих фармакокинетические параметры лекарственных препаратов: печеночная, почечная, сердечная недостаточность, заболевания желудочно-кишечного тракта.
7. При наличии лекарственных взаимодействий. Так, например, ацикловир взаимодействует с фенитоином и вальпроевой кислотой, что приводит к снижению эффективности как противосудорожной, так и противовирусной терапии [4].

Ниже мы приводим данные по терапевтическому лекарственному мониторингу противовирусных препаратов.

Комбинация интерферона- α и рибофлавина используется в качестве стандартной терапии хронического гепатита С. Для оптимизации дозирования рибофлавина необходимо учитывать массу тела пациентов. Была проведена популяционная оптимизация назначения препарата с учетом веса, роста, пола, клиренса креатинина, возраста пациентов. Была построена линейная двухкамерная фармакокинетическая модель, описывающая распределение рибофлавина в организме, при этом скорость элиминации препарата была прямо пропорциональна клиренсу креатинина. На скорость выведения препарата также незначительно влиял возраст пациентов и их вес. Показано, что наилучшая согласованность клинических и теоретических данных наблюдается при использовании только веса пациентов. Авторы предлагают использовать данную модель для оптимизации терапии рибофлавином. На 63 больных ими было показано, что применение фармакокинетической оптимизации терапии (на основе терапевтического лекарственного мониторинга) рибофлавином больных хроническим гепатитом С приводит к повышению эффективности противовирусного лечения. Ни в одном случае не было отмечено развитие токсических эффектов рибофлавина, связанных с передозировкой препарата [5].

Была проведена фармакокинетическая оптимизация терапии, основанная на терапевтическом лекарственном мониторинге паливизумаба. Паливизумаб представляет собой человеческие моноклональные антитела к респираторному синциальному вирусу. У де-

тей, имевших контакт с зараженными людьми, необходимо проводить профилактическое лечение антителами с тем, чтобы избежать развития возможных осложнений. Применение эмпирической схемы дозирования паливизумаба в 35% случаев приводит к развитию токсических эффектов препарата. Проведение терапевтического лекарственного мониторинга и последующей оптимизации схемы применения паливизумаба позволило не только полностью избежать развития токсических эффектов препарата, но и сократить затраты на лечение [6].

Основой для фармакокинетической оптимизации терапии противовирусными препаратами является определение концентраций лекарственного вещества в различных биологических жидкостях (кровь, моча, спинномозговая жидкость, амниотическая жидкость и др.) в определенные моменты времени после приема препарата. Выбор объекта исследования зависит от многих факторов. В первую очередь, он определяется доступностью исследуемого материала. Как правило, наиболее удобными объектами исследования являются кровь и моча. Исследования уровня концентраций лекарств в крови — наиболее распространенный фармакокинетический подход для оптимизации фармакотерапии еще и потому, что фармакокинетические параметры, полученные в этом случае, можно коррелировать с данными биохимического анализа крови пациента.

В настоящее время только-только разрабатываются методы определения концентрации противовирусных препаратов в крови. Существует целый ряд методических сложностей, связанных тем, что препараты данной группы находятся в крови в низких концентрациях. При определении концентрации интерферонов необходимо различать эндогенные и экзогенные субстанции. Как правило, для определения концентрации противовирусных препаратов в крови используются радиоиммунные методы и жидкостная хроматография. Требования, предъявляемые к методам анализа в нескольких словах, следующие:

- чувствительность определения,
- экспрессность анализа,
- точность анализа,
- возможность работы с малым объемом биоматериала,
- стоимость анализа.

Иммунологические методы, к безусловным достоинствам которых можно отнести относительную простоту и экспрессность проведения непосредственных измерений, занимают по праву одно из ведущих мест. Однако необходимо знать, что применение подобных методов сопряжено с определенными трудностями: необходимы специальная аппаратура и наборы, существующие далеко не для всех лекарственных средств, для которых терапевтический лекарственный мониторинг остро необходим. Кроме этого, стоимость наборов достаточно высока и определение, даже разовое, обходится достаточно дорого.

Для правильного определения концентрации того или иного противовирусного препарата в крови не достаточно использовать специфических метод, также необходим процесс подготовки проб для анализа. В основном, процесс подготовки проб для анализа сводится к следующим процедурам:

1. Получение сыворотки крови.
2. Извлечение препарата в удобной для анализа форме (одно- или многократная экстракция препарата химическими растворителями или процесс осаждения белков тем или иным реагентом. В последнем случае необходимо помнить, что при осаждении белков сыворотки крови происходит разбавление образца, что влияет на чувствительность метода анализа).
3. Сохранение образца в виде сывороточных экстрактов, сыворотки крови, упаренных образцов в сухом виде и т.д. для последующего анализа.

Следует помнить, что при проведении фармакокинетических исследований некоторые препараты довольно быстро подвергаются биотрансформации

(окислению, гидролизу и т.п.). Исходя из этого, каждый исследователь определяет минимальные и максимальные сроки проведения анализа. В процессе разработки метода следует также рассмотреть и исключить (или по возможности стандартизировать) все возможные варианты потерь вещества при проведении основных и вспомогательных операций, чтобы избежать ошибок в анализе.

С нашей точки зрения, с развитием методов определения концентрации противовирусных препаратов, также будут совершенствоваться и методы их терапевтического лекарственного мониторинга. В перспективе можно надеяться, что терапевтический лекарственный мониторинг противовирусных препаратов станет таким же будничным делом, как и мониторинг антиконвульсантов. В связи с Приказом № 494 Министерства Здравоохранения РФ от 22.10.2003 «О совершенствовании деятельности врачей-клинических фармакологов» фармакологическая оптимизация терапии противовирусными препаратами может стать одной из обязанностей врача клинического фармаколога.

ЛИТЕРАТУРА

1. Linssen-Schuurmans C.D., van Kan E.J., Feith G.W., Uges D.R. — Ther. Drug Monit., 1998. V. 20. N 4. P. 385-386.
2. Van Heeswijk P.P. — Ther. Drug. Monit., 2002. V. 24. N. 3. P. 323-331.
3. Boulieu R., Bastein O., Gaillard S., Flamens C. — Ther. Drug Monit., 1997. V. 19. P. 701-704.
4. Parmeggiani A., Riva R., Posar A., Rossi P.G. — Ther. Drug Monit., 1995. V. 17. P. 312-315.
5. Bruchfeld A., Lindahl K., Schvarcz R., Stahle L. — Ther. Drug. Monit., 2002. V. 24. N. 6. P. 701-708.
6. Zaaijer H.L., Vandenbroucke-Grauls C.M., Frassen E.J. — Ther. Drug Monit., 2002. V. 24. N. 3. P. 444-445.

Клинический случай применения ванкомицина по поводу MRSA-сепсиса у больного с терминальной недостаточностью трансплантата почки

О.И. Денисова

Воронежская областная клиническая больница №1

В настоящее время инфекция, вызванная метициллин-резистентными стафилококками (MRS), является одним из наиболее значимых госпитальных осложнений у больных хирургического профиля. По данным микробиологического мониторинга в больнице за 2002 г., распространенность метициллинорезистентных стафилококков в отделениях термической травмы составила 70%; в гнойной хирургии, ОПИТ, урологии и онкоурологии — 60%; в отделении трансплантации почки и гемодиализа — 57%. За последние три года отмечается неуклонный рост данного показателя.

Трудность проведения антибактериальной терапии MRS-инфекции заключается в крайне ограниченном спектре препаратов выбора. При тяжелой и генерализованной MRS-инфекции — это ванкомицин, тейкопланин и линезолид. Но применение тейкопланина и линезолида практически недоступно в связи с высокой стоимостью лечения. Могут быть эффективны фторхинолоны, их комбинация с рифампицином, ко-тримоксазол, но эти препараты используют только при подтвержденной чувствительности, учитывая наличие ассоциированной резистентности MRS к фторхинолонам и быстрый рост резистентности при монотерапии рифампицином. Альтернативным вариантом может быть использование фузидина натрия, но в России в настоящее время его парентеральная форма отсутствует и, кроме того, по его применению при тяжелой инфекции не накоплен достаточный клинический опыт.

В каждой конкретной клинической ситуации лечения MRS-инфекции имеются свои особенности, связанные с наличием у больного факторов риска, усугубляющих тяжесть заболевания; с возможностью проникновения антибактериального препарата в очаг инфекции, индивидуальной переносимостью самого антибактериального препарата и т.д.

Наиболее проблематично лечение MRS-инфекции у пациентов отделения трансплантации почки и программ гемодиализа. Необходимо учитывать ряд значимых факторов, от которых зависит прогноз заболевания: наличие и отсутствие иммуносупрессивной терапии, состояние экскреторной функции почек или

трансплантата почки, наличие выраженных нарушений основных показателей гомеостаза, лекарственное взаимодействие одновременно назначаемых препаратов, пути выведения из организма конкретного антибактериального препарата (препарата выбора) при нарушении функции почек и при проведении гемодиализа, необходимость мониторинга концентрации препарата в крови.

При фармакотерапии тяжелой MRS-инфекции выбора препаратов практически нет (теоретически это тейкопланин, линезолид, комбинации с рифампицином). По применению ванкомицина у больных, находящихся на гемодиализе, рекомендации в доступных источниках фармакологической информации отсутствуют либо рекомендуется его не использовать. В норме ванкомицин на 90% выводится из организма почками в неизмененном виде, при гемодиализе не элиминируется, обладает ото-, нефро-, гемато- и гепатотоксичностью.

Клинический случай применения ванкомицина по поводу сепсиса, вызванного метициллинрезистентным штаммом *S.aureus*, у больного с терминальной недостаточностью функции трансплантата почки представляется интересным для специалистов, занимающихся антибактериальной химиотерапией.

Пациент поступил в отделение трансплантации почки и гемодиализа с диагнозом «хронический гломерулонефрит, хроническая почечная недостаточность, терминальная стадия, состояние аллотрансплантации трупной почки, реакция отторжения трансплантата, терминальная стадия недостаточности трансплантата почки». Через 2 мес. консервативного лечения у больного развилась клиника септической пневмонии, по поводу которой проводилась антибактериальная терапия цефоперазоном (Цефобид, Пфайзер) без положительной динамики. Из крови был выделен *S.aureus*, резистентный к бета-лактамам, фторхинолонам, макролидам, но чувствительный к ванкомицину.

Коллегиально по жизненным показаниям было принято решение назначить ванкомицин. Используя данные популяционного моделирования и зарубеж-

ный опыт применения ванкомицина у больных, находящихся на программном гемодиализе [3, 5, 6], был рассчитан индивидуальный режим дозирования препарата при использовании программы USC*PACK; University of Southern California, Los Angeles, U.S.A.), разработанной в лаборатории прикладной фармакокинетики Университета Южной Калифорнии [1, 2, 4]. Поскольку терапевтический лекарственный мониторинг ванкомицина в крови был недоступен, начальный режим дозирования для данного пациента 50 лет (75 кг, 175 см) был рассчитан на основе средних значений фармакокинетических параметров двухкамерной популяционной модели поведения ванкомицина с учетом отсутствия у данного пациента почечного пути выведения препарата. Терапевтическая цель была выбрана как минимальный уровень ванкомицина в крови перед следующим введением 10-20 мг/л. По усредненным расчетам нагрузочная доза ванкомицина 500-1000 мг должна была привести у такого пациента к концентрации препарата в крови 20-40 мг/л.

Последующие поддерживающие дозы были оценены в 25-50 мг/сут, или как средняя скорость введения

175-300 мг/нед. Эти результаты согласовывались с опубликованными ранее в литературе для пациентов с крайне тяжелыми необратимыми нарушениями почечной функции [3, 5, 6].

Спустя три дня после первого введения ванкомицина появилась значительная положительная динамика инфекционного процесса (снижение гипертермии, лейкоцитоза, улучшении рентгенологической картины пневмонии). Через 10 дней от начала лечения ванкомицином стал возможен переход на пероральную терапию комбинацией препаратов фузидина с рифампицином в течение 14 дней. Учитывая двойной путь выведения, коррекции режима дозирования фузидина и рифампицина не потребовалось.

Признаки септической пневмонии купировались к концу 2-й нед. Спустя 2 мес. больному была благополучно проведена операция по удалению нефункционирующего трансплантата почки. В настоящее время пациент получает программный гемодиализ, чувствует себя удовлетворительно. Длительность периода наблюдения данного пациента после случая лечения его ванкомицином составила 10 мес.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bayard D.S., Jelliffe R.W., Schumitzky A., Milman M.H., M. Van Guilder. Precision Drug Dosage Regimens Using Multiple Model Adaptive Control: Theory, and Application to Simulated Vancomycin Therapy // In Vasudevan Memorial Volume on Theoretical Physics, Stochastic Processes, and Biological Science, Rao KS Sridhar R (eds), World Scientific Publishing Co., 1990.
2. Bayard D.S., Schumitzky A., Milman M.H. «Design of Dosage Regimens: a Multiple Model Stochastic Control Approach» // Internat J Bio-Med Comput 36: 103-115, 1994.
3. Goodman, Gilman, 9th edition, 1996, p. 1144.
4. Jelliffe R.W., Schumitzky A., Van Guilder M., Jiang F. User Manual for Version 10.7 of USC*PACK Collection of PC Programs. Laboratory of Applied Pharmacokinetics, University of Southern California, School of Medicine, Los Angeles, 1996.
5. Krothapalli R.K., Senekjian H.O., Ayus J.C. Efficacy of intravenous vancomycin in the treatment of gram-positive peritonitis in long-term peritoneal dialysis // Am. J. Med. 1983, 75: 345-348.
6. Nolan C.M., Flanagan W.J., Rastogi S.P., Brewer T.E. Vancomycin penetration onto CSF during treatment of patients receiving hemodialysis // Southern Med. J. 1980, 73: 1333-1334.

Какие фосфолипиды «эссенциальнее»?

К.Г. Гуревич

Кафедра ЮНЕСКО «Здоровый образ жизни — залог успешного развития»,
МГМСУ, г. Москва

Препараты, содержащие эссенциальные фосфолипиды, в настоящее время широко используются для лечения заболеваний печени. Выбор конкретного препарата остается за врачом с учетом его знаний, касающихся не только заболеваний печени, индивидуальных особенностей пациента, но и знаний о качестве лекарственных препаратов, о технологиях производства и очистке активных веществ. В настоящее время на фармакологическом рынке РФ представлен большой спектр лекарственных препаратов и БАД, содержащих эссенциальные фосфолипиды, но не все они являются гепатопротекторами.

Фосфолипиды (или фосфоглицериды) принадлежат к классу высоко специализированных липидов и являются компонентами клеточных мембран и мембран органелл, например митохондрий, клеток животных, растений и микроорганизмов [5, 11]. Фосфолипиды также называют «эссенциальными» в силу их качеств, незаменимых для роста, развития и надлежащего функционирования всех соматических клеток. В дополнение к их роли в составе клеточных мембран, следует сказать, что фосфолипиды — это важные составляющие сурфактанта в альвеолах легких, липопротеинов и желчи. Они принимают участие в работе нервной системы, в мембранных ферментативных реакциях и других метаболических процессах.

Фосфолипиды, находящиеся в тромбоцитах, принимают участие в процессе свертывания крови, что в конечном итоге показывает их влияние на защитную функцию крови и гемодинамику в организме млекопитающих и человека. Химическая структура фосфолипидов, их дифильность, наличие заряженных групп определяет уникальность их физиологических свойств.

Главная функция фосфолипидов — формирование двойного липидного слоя в мембранах клеток. Структура и функция клеточных мембран имеет чрезвычайно важное значение для здоровья человека. Некоторые симптомы могут быть объяснены нарушением или повреждением функций мембран или их неустойчивостью. Путем введения фосфолипидов можно влиять на мембранные функции, связанные с мембранными белками, и воздействовать на нарушенную функцию.

Молекулярная структура фосфолипидов напоминает структуру триглицеридов, но в отличие от последних в молекуле фосфолипидов одна из трех жирных кислот замещена сложным эфиром фосфорной кислоты. Фосфолипиды различают в зависимости от природы заместителя, связанного с фосфорнокислой группой. Основным, наиболее исследованным представителем фосфолипидов является лецитин.

Термин «лецитин» берет свое начало от греческого слова «lekithos». Впервые лецитин был выделен из яйца в 1846 г. французским химиком Морисом Гоблеем. Пионерские работы в области выделения растительного лецитина проводились доктором Бруно Ревалдом в 1920-х гг. Выделение и очистка лецитина от различных источников описана в работах Kuksis [1985] и Prosise [1985].

Первоначально термин использовался для обозначения фосфорсодержащих липидов, полученных из яичного желтка, позже использовался как синоним для обозначения только одного определенного фосфолипиды — фосфатидилхолина (ФХ), т. к. он является главным компонентом фракции фосфатидов, извлекаемых из яичного желтка либо из бобов сои.

В научной литературе термин «лецитин» обозначает 1,2-диацил-глицеро-3-фосфатидилхолин. В противоположность этому в промышленности (в т. ч. в технологии лекарств и пищевых добавок) и коммерции термин «лецитин» понимается несколько иначе и используется для обозначения сложной смеси нейтральных липидов (преимущественно триглицеридов, малого количества жирных кислот в свободном состоянии и стеролов), полярных липидов (фосфо- и гликолипиды) и углеводов. Например, определение лецитина в фармакопее США выглядит так: комплексная смесь ацетон-нерастворимых фосфатидов, которые состоят в основном из фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола, в комбинации с различным количеством других субстанций — триглицеридов, жирных кислот, углеводов [16].

Для практических нужд интересны источники, которые имеют высокие концентрации фосфолипидов. Лучшим источником из животных продуктов являются яйца, но он очень дорог. Растительные источники — семена подсолнечника, кукуруза, арахис и другие масляные семена также важные источники фосфолипидов.

дов, но наиболее важны для производства соевые бобы. Фосфолипидный состав лецитина зависит от источника, климата, почвы, условий произрастания и сбора урожая. Наиболее популярный из всех лецитинов — соевый лецитин. Технология производства значительно влияет на состав и свойства лецитина.

В последние десятилетия происходило бурное развитие методов качественного и количественного анализа сложных комплексных препаратов природного происхождения, в т. ч. и фосфолипидов. Значительные результаты были достигнуты в разработке методов разделения и идентификации индивидуальных фосфолипидов с использованием комбинации хроматографических методов и спектроскопии. Это позволяет очень тщательно контролировать технологический процесс получения фосфолипидов (например, лецитина), начиная от контроля исходного сырья до полупродуктов его очистки и конечных коммерческих продуктов.

Поскольку коммерческие препараты лецитина подразумевают наличие не индивидуального вещества, а довольно-таки сложный состав, то стандартизация фосфолипидов, кроме их идентификации и количественного анализа, подразумевает анализ показателей качества важных в технологии жиров. Так, например, AOCS (American Oil Chemists' Society) рекомендует следующие испытания для стандартизации лецитина: определение ацетон-нерастворимого вещества, толуол-нерастворимого вещества, кислотного числа, величину окрашивания по йоду, перекисного числа, вязкости, pH, удельного веса, содержания тяжелых металлов, микробной контаминации [9]. Такое количество стандартизуемых параметров при определении качества лецитина и других фосфолипидов говорит об исключительной важности физико-химических свойств этих соединений при выборе коммерческого продукта от различных фирм-производителей для пищевого и терапевтического использования. Коммерческий (сырой) лецитин, который является исходным компонентом, используемым для создания лекарственных препаратов, пищевых добавок и других продуктов, имеет довольно сложный состав. Он состоит приблизительно из 64% смешанных фосфатидов и 36% сырого масла сои. Все коммерческие лецитины неодинаковы: их состав и свойства могут изменяться в зависимости от источника и технологии получения.

В медицине и фармации использование лецитина как продукта требует выделения его активного начала, группы веществ, которые вносят наиболее значительный вклад в его фармакологические и физико-химические свойства. Разработка эффективных способов идентификации и разделения смесей фосфолипидов позволяет говорить о том, что в подавляющем большинстве случаев применения препаратов лецитина в медицине основывается и объясняется присутствием в его составе фосфатидилхолина (ФХ). Различия в при-

менении лецитина в качестве лекарственного препарата и как вспомогательного вещества в технологии лекарств, пищевой промышленности и других областях требуют различных степеней очистки сырья. Из сырого лецитина путем обезжиривания удаляются в первую очередь нейтральные липиды (триглицериды), диглицериды и др. После чего сырой лецитин уже называют «чистым лецитином». Он обычно представляет собой твердый сыпучий порошок (или гранулы) и является доступным коммерческим продуктом с содержанием фосфатидилхолина приблизительно в 25-30% (по весу).

Дальнейшая глубокая очистка лецитина удаляет природные примеси ФХ (также фосфолипидной природы), например фосфатидилэтаноламин (ФЭ), который представляет собой одно из множества различных соединений (обозначаемых как «минорные» компоненты), в нативном состоянии находящиеся вместе и выделяющиеся совместно с ФХ. Очистка лецитина от присутствия ФЭ приводит к улучшению некоторых технологических свойств коммерческих препаратов, в частности препаратов парентерального лецитина (улучшаются эмульгирующие свойства за счет повышения содержания ФХ).

В противопоставление ФХ, который имеет двухполярный заряд своей гидрофильной группы, некоторые его примесные компоненты имеют отрицательный заряд или вовсе не имеют заряда при нейтральных значениях pH. Их структурное различие приводит к различию в гидратации их гидрофильных частей молекул. В работе *Hansrani* упомянуто, что различные «минорные» примеси лецитина, особенно лизофосфолипиды, способны влиять на стабильность эмульсий. Последние образуются путем гидролиза жирных кислот, преимущественно в позиции 2 в молекуле соответствующего фосфолипида. «Минорные» компоненты лецитина способны не только влиять на технологию лекарственных препаратов, если они используются при их производстве, но в ряде случаев могут непосредственно вызывать нежелательные лекарственные явления. Так, например, соевый фосфатид частично трансформируется в изолецитин и по мере накопления увеличивает свою токсичность [19]. Вот почему так важны вопросы соблюдения технологий очистки лецитина.

Следует отметить, что технологии производства фосфолипидов постоянно совершенствуются. Примером такого рода может служить технология, разработанная кафедрой технологии жиров, товароведения и экспертизы товаров КубГТУ. Исследовался процесс обезжиривания фосфолипидного концентрата при различных соотношениях фосфолипидного концентрата и ацетона, определялись границы расслаивания полученной трехкомпонентной системы фосфолипиды — ацетон — нейтральные липиды. На основании полученных новых экспериментальных данных совер-

шенствование технологии получения обезжиренных фосфолипидов за счет совершенствования процесса обезжиривания фосфолипидного концентрата позволило снизить расход органического растворителя, а также энергозатраты на регенерацию растворителя из мицеллы. Экспериментально подтверждено, что экономия растворителя составила от 6,4 до 8,5 кг растворителя на 1 кг сырых растительных фосфолипидов (2,5-3,0 раза), экономия энергии на регенерацию растворителя составила от 4,119 до 5,139 МДж на 1 кг фосфолипидного концентрата. При этом качество полученных по усовершенствованной технологии обезжиренных фосфолипидов не хуже, чем у полученных по старой технологии. С другой стороны, если расход растворителя оставить таким же, как в старой технологии, применение усовершенствованной технологии позволит значительно улучшить качество обезжиренных фосфолипидов, что подтверждено как расчетными, так и экспериментальными данными. Так, в обезжиренных фосфолипидах, полученных по новой технологии, массовая доля масла ниже на 1,0-1,5 %, массовая доля фосфолипидов выше на 1,05-1,6 %, чем в обезжиренных фосфолипидах, полученных по старой технологии. Фосфолипиды, полученные по усовершенствованной технологии, имеют более высокие физиологические и органолептические свойства, что обусловлено меньшей массовой долей масла и нежелательных примесей [6].

Столь подробное изложение технологических деталей при производстве препаратов эссенциальных фосфолипидов вполне оправдано. Центральное место в терапевтическом эффекте подобных препаратов отводится фосфатидилхолину (ФХ): от содержания его в лекарстве, качества очистки, наличия примесей зависит, в конечном итоге, успех лечения.

Существует понятие «минимум органа»: для печени достаточно менее половины ее массы для осуществления всех необходимых функций организма. Несмотря на колоссальный резерв печени, ее способности не безграничны. Широкий диапазон печеночных функций и возможность их восстановления связаны со способностью производить новые клеточные мембраны, которые в среднем состоят на 65% из ФХ. Это наглядно доказывает важность ФХ как структурообразующего вещества, незаменимого для оптимальной функции печени.

Установлено, что ФХ значительно ускоряет восстановление печени при токсическом воздействии, уменьшает окисление липидов свободными радикалами; замедляет мембранное повреждение, фиброз и жировую инфильтрацию ткани печени; увеличивает синтез клетками РНК и белка, что предполагает ускорение регенерации; улучшается обмен веществ в печени. ФХ совместим с фармацевтическими препаратами и другими питательными веществами. Его биодоступность

составляет приблизительно 90% введенного количества в течение 24 ч. Кроме этого, ФХ увеличивает биодоступность питательных веществ, с которыми он вводится совместно.

Наиболее ярким представителем лекарственных препаратов эссенциальных фосфолипидов, широко известным среди специалистов и пациентов, является препарат Эссенциале форте фирмы «Наттерманн». За длительный период (несколько десятилетий) использования в медицинской практике СССР, России и стран СНГ он стал классическим лекарственным средством, вошедшим во многие медицинские учебники и справочники препаратов группы эссенциальных фосфолипидов. Эссенциале оказался эффективен для лечения неалкогольного стеатогепатита [14]. Препарат успешно применялся при терапии вирусных гепатитов В, С и D [15], был получен положительный результат при лечении больных печеночной энцефалопатией [17]. Результаты 155 исследований с участием 10 049 пациентов доказывают эффективность Эссенциале. Клинические исследования доказали, что при пероральном применении Эссенциале в дозе 1-3 г/сут удается достигнуть следующих клинически значимых эффектов:

- уменьшить уровень индикаторных печеночных ферментов в плазме крови;
- ослабить перекисное окисление липидов;
- уменьшить степень выраженности мембранных повреждений;
- ускорить регенерацию гепатоцитов;
- улучшить процессы метаболизма, протекающие в печени.

Так как на современном этапе развития медицины значение, которое ранее придавалось включению витаминов в состав гепатопротекторных препаратов пересмотрено, место Эссенциале форте занял препарат Эссенциале форте Н — препарат без витаминного комплекса. Назначение витаминов и микроэлементов следует тщательно обосновывать в каждом конкретном случае. При этом необходимо учитывать физиологическое состояние организма (наличие беременности, например), аллергологический анамнез, возраст, профессию и другие факторы. От обобщенного подхода к включению витаминов в состав лекарственных препаратов следует отказаться. Кроме того, некоторые ситуации предусматривают назначение высоких суточных доз «эссенциальных» фосфолипидов, ранее же наличие витаминного комплекса в составе Эссенциале резко лимитировало дозу лекарства. Во многих случаях при тяжелых поражениях печени необходимо увеличение продолжительности лечения, при этом повышение дозы витаминов при использовании Эссенциале было бы нецелесообразным. В таких случаях обоснованным является применение Эссенциале Н.

Таблица

№ п/п	Денситометрический	Количество	Площадь	Результат весовые	RF
1	0	0.000	0.000	0.000	0.35
2	60	0.003	0.005	0.000	0.09
3	1566	0.072	0.038	0.000	0.02
4	2158	0.099	0.047	0.000	0.02
5	2244	0.103	0.078	0.000	1.11
6	-3	-0.000	0.001	0.000	0.10
7	0	0.000	0.000	0.000	0.00
8	12935	0.595	0.772	0.000	0.37
9	2760	0.127	0.061	0.000	0.02

Необходимо отметить, что результаты всех доклинических исследований препарата *in vivo* и *in vitro* были получены именно для «чистой» EPL-субстанции, без каких-либо добавочных компонентов. Другими словами, доказано, что эффект препарата обеспечивают «эссенциальные» фосфолипиды. У пациентов, получавших препарат, не содержащий витаминов, лечение было также высоко эффективным. Именно поэтому стали выпускать препараты Эссенциале форте Н (капсулы) и Эссенциале Н (раствор для инъекций в ампулах), содержащие только «эссенциальные» фосфолипиды, в которых отсутствовали витамины. Одна капсула препарата содержит 300 мг «эссенциальных» фосфолипидов, а 5 мл раствора — 250 мг. Состав этих лекарственных форм препарата соответствует современному пониманию механизмов поражения печени и дает возможность проводить целенаправленное, а значит, наиболее эффективное лечение пациентов с заболеваниями печени. Показания к применению препарата достаточно хорошо известны врачам и фармацевтам и с появлением Эссенциале Н не изменились. Прежде всего, Эссенциале Н применяется для лечения таких заболеваний печени, как жировая дегенерация печени различной этиологии, хронический гепатит, цирроз печени, лекарственное и алкогольное поражение. Кроме того, препарат успешно применяют для лечения отравлений, токсикозов беременных и в случае нарушения функции печени, возникших в результате осложнений при других заболеваниях. Рекомендуются использование препарата при псориазе.

Помимо Эссенциале форте Н уже несколько лет существуют и другие препараты эссенциальных фосфолипидов, в частности Эсливер форте («Наброс Фарма», Индия. Маркетинг и дистрибуция ОАО «Нижфарм»). Ради справедливости, следует отметить, что компания «Нижфарм» изменила дизайн упаковки препарата Эсливер форте, который ранее копировал элементы дизайна, использованного при оформлении упаковки для препарата Эссенциале форте [2, 3]. Однако содержание капсул остается прежним. По данным нового анализа (31.07.2003 г.), проведенного в порядке оказания консультативной помощи, сравнива-

лись лекарственные препараты Эссенциале форте Н серии 21711 фирмы «Рон-Пуленк Рорер» (Германия) и Эсливер форте серии 121702 фирмы Nabros Pharma Pvt. Ltd. (Маркетинг и дистрибуция ОАО «Нижфарм», Россия). Препарат Эсливер форте представляет собой порошок светло-оранжевого цвета с запахом, находящийся в красно-коричневых капсулах. Препарат Эссенциале форте Н — густое мазеподобное вещество темного цвета в капсулах светло-коричневого цвета.

Содержимое капсул экстрагировали смесью хлороформ:метанол (2:1). Полученные экстракты наносили на хроматографические пластины НРТС размерами 10*10 см фирмы «Мерк» (Германия). Хроматографирование проводили в системах: 1) хлороформ:метанол:вода 65:25:4; 2) хлороформ:метанол:водный аммиак 14:6:1. Визуализацию пятен проводили в парах йода, количественное определение методом нормализации площадей хроматографических пятен с использованием прибора ДЕНСКАН фирмы ЛЕНХРОМ (Россия) в видимом свете и в УФ-свете при длинах волн 254 и 365 нм.

В результате проведенных исследований установлено, что основную массу фосфолипидов препарата Эссенциале форте Н более 90% составляют изомеры фосфатидилхолина с незначительными примесями других фосфолипидов.

Указанная фракция фосфолипидов плохо выражена в препарате Эсливер форте. Кроме того, в нем обнаружено присутствие хроматографических зон, соответствующих фосфатидилинозиду и фосфатидилсерину [7].

При последующей экспертизе Эсливера форте (Nabros Pharma Pvt. Ltd. Kheda 387411, маркетинг и дистрибуция ОАО «Нижфарм») в той же лаборатории от 20.10.2003 г. было выявлено, что фракция фосфолипидов, представленная изомерами фосфатидилхолина, в исследуемом препарате выражена слабо и составляет менее 10%, порядка 90% — это витамины и примеси других фосфолипидов [18].

Обращает на себя внимание следующая строка на упаковке Эсливера форте: «По техническим указаниям

Доктора Винклера Гмбх, Германия». Доктор Винклер Гмбх — это немецкая компания, производящая медицинскую технику, известна подушками и охлаждающими компрессами [13].

Почему для препарата применяются технические указания именно этой немецкой компании, может быть, недостаточно только правил GMP?

Из представленных и ранее сравнительных результатов анализа видно, что по фосфолипидному составу Эсливер форте приближается к неочищенному соевому лецитину. По данным лаборатории химии липидов Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, при сравнении соотношения содержания ФХ в этих двух препаратах видно, что содержание ФХ в препарате Эсливер форте в 1,5–2 раза меньше, чем в препарате Эссенциале форте. Таким образом, по содержанию активного компонента — ФХ препараты эссенциальных липидов существенно различаются, что при одинаковой дозировке уже приведет к снижению активного компонента в лекарственной форме.

Проведенное 26.04.2000 г. сравнительное исследование двух разных партий Эсливер форте в лаборатории A.Nattermann&Cie. GmbH, Кельн, Германия, показало, что качество продукта следует считать абсолютно неприемлемым, особенно качество основного активного ингредиента Essentielle Phospholipid (EPL), которое явно идентифицируется как неочищенный соевый лецитин, несравнимо с высокими требованиями в отношении качества предъявляемым к EPL-субстанции Nattermann. Применение низкотехнологичных препаратов из эссенциальных фосфолипидов вводит в заблуждение потребителей и может дискредитировать оригинальные высокоэффективные препараты Эссенциале форте Н в форме капсул, а также ставит под сомнение уже подтвержденную эффективность и целесообразность терапии ряда заболеваний препаратами EPL [1–3].

В период с декабря 2001 г. по июль 2002 г. в двух центрах — на кафедре госпитальной терапии с курсом врача общей практики Казанского государственного медицинского университета на базе 1-й Городской клинической больницы г. Казани и на кафедре факультетской терапии №2 лечебного факультета ММА им. И.М. Сеченова — проходило открытое клиническое исследование (по Протоколу №RU/N/02/3), в котором участвовали 22 и 20 пациентов соответственно. Выводы провозглашали, что изучаемый препарат Эсливер форте не уступает по терапевтической эффективности препарату Эссенциале форте Н и может применяться наравне с последним в лечении больных с алкогольной болезнью печени (АБП) [20].

Еще в одном центре — Городской больнице №33 г. Н.Новгорода в открытое клиническое исследование

(по Протоколу №RU/N/02/3) были включены 54 пациента с АБП в стадии стеатоза и гепатита. 27 человек принимали Эсливер форте по 2 капсулы 3 раза в течение 12 недель, и 27 пациентов получали Эссенциале форте Н по 2 капсулы 3 раза. В результате был сделан вывод, что «исследуемый препарат Эсливер форте не уступает по терапевтической активности препарату сравнения Эссенциале форте Н и даже несколько превосходит его действие за счет комплекса витаминов, что выразилось в более сильном эффекте у пациентов, вошедших в исследование в зимне-весеннее время (с января по май)»! Однако выводы по результатам клинических исследований, инициированных компанией Нижфарм, где было показано некоторое превосходство препарата Эсливер форте над Эссенциале форте Н, плохо согласуются с результатами анализов содержания активного вещества и степени его очистки в препарате [3,7,12,18]. Что касается частностей — при оценке качества жизни (КЖ) было показано некоторое превосходство препарата Эсливер форте над Эссенциале форте Н, КЖ оценивалось с помощью модифицированного опросника САН [10]. Это очень небольшой бланковый тест предназначен для оперативной оценки самочувствия, активности и настроения (по первым буквам этих функциональных состояний и назван опросник). Сущность оценивания заключается в том, что испытуемых просят соотнести свое состояние с рядом признаков по многоступенчатой шкале. Результат оценки касается лишь психо-эмоционального статуса испытуемых на момент проведения опроса. Эта оценка, несомненно, является лишь небольшим компонентом такого серьезного понятия как качество жизни [4].

А.С. Топорков, в одной из статей, недавно опубликованных в Русском Медицинском Журнале [12], рассматривая состав Эсливера форте, сообщает, что этот препарат отличается от Эссенциале своим фосфолипидным составом. Фосфатидилхолин составляет 81,9% от суммы фосфолипидов в Эссенциале и 38,6% — в Эсливер форте. Однако пишет тот же автор, Эсливер форте дополнительно содержит фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол. Необходимо снова подчеркнуть, что все эти три соединения являются, так называемыми, «минорными» компонентами лецитина, и при очистке последнего, максимально удаляются из препарата. Но только фосфатидилхолин, представляет наибольший интерес в отношении терапевтического действия препаратов эссенциальных фосфолипидов. Таким образом, сравнение выглядит некорректным, когда наличие основного действующего вещества в препарате оказывается недостаточным, а избыточное присутствие «минорных» компонентов преподносится как дополнительное преимущество препарата Эсливер форте. Кроме того, несмотря на качественные различия в составе Эссенциале и Эсливер форте, в той же статье реко-

мендации по приему выглядят сходными — 2 капсулы трижды в день. Хотя при таком содержании активного вещества, теоретически следовало бы рекомендовать повышение дозировки.

В заключении необходимо подчеркнуть, что среди большого количества лекарственных препаратов и БАД, содержащих эссенциальные фосфолипиды, остается еще немало препаратов сомнительного качества, и что в производстве лекарственных препаратов на

всех этапах необходимо серьезное отношение к применяемым технологиям — от субстанции до упаковки, в конечном итоге — это всегда вопрос безопасности и эффективности лекарства для пациента. При выборе терапии современные врачи должны знать не только средство лечения конкретного заболевания у конкретного пациента, но и иметь представление о качестве лекарственных препаратов, технологиях производства и очистке активных компонентов лекарств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Под ред. С.Скаткова «Фармакотерапия: Эссенциальные фосфолипиды: имитация путем заимствования» Фармацевтический вестник, №23 (222) 24 июля 2001 г.
2. Смирнов И.И., Качественная Клиническая Практика, 2001. № 2. С. 67-74.
3. К. Г. Гуревич, Качественная Клиническая Практика, 2002. № 4. С. 108-111.
4. Е.Н. Семернин и др. Качественная Клиническая Практика, 2001. № 2. С. 48-52
5. В. Е. Васковский, Липиды, Соросовский образовательный журнал, № 3, 1997, с. 32-37.
6. А.А.Лобанов, Е.Н. Константинов, Совершенствование технологии получения обезжиренных фосфолипидов, Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. 2001, №5 Специальный выпуск, InformCrossScience 1999-2001
7. МО РФ, III Центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз, Отдел химико-токсикологической экспертизы, акт исследования 31 июля 2003 г., Москва
8. А.С. Топорков, Применение эссенциальных фосфолипидов в терапии алкогольной болезни печени, Русский Медицинский Журнал, Том 11, №14, 2003, С 836-838.
9. www.kancorflavours.com
10. psynet.by.ru
11. под ред. С.А. Скатков, Фосфолипиды и их значение в организме человека, Фарматека, №7, 2001, С 26-30.
12. С.А. Сергеева, И.Н. Озерова, Сравнительный анализ фосфолипидного состава препаратов эссенциале форте и эссливер форте, Фармация №3, 2001, С 32-34.
13. www.dr-winkler-kg.de
14. Ивашкин В.Т., Шульпекова Ю.О. Гастроэнтерология, 2002
15. Корочкина О.В., Цыбасова А.И., Соринсон С.Н. Consilium-Medicum, 2002. Т. 4. № 1. Приложение.
16. USP23, NF18. p.2259
17. Маев И.В., Гуревич К.Г. Росс. журн. гастр., гепатол. и колонопроктол, 2001. № 4. С. 41-45.
18. Симонов Е. Акт исследования МО РФ, III Центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз, Отдел химико-токсикологической экспертизы, 31 июля 2003 г., Москва
19. А. Вретлинд, А.Суджан «Клиническое питание», с. 92, Стокгольм-Москва, 1990
20. Кузнецов А.С., Артемова А.В., Диагностика и лечение в гастроэнтерологии, Медицинская кафедра, №4, 2002, С 64-67, 134-139

Фармакоэкономическое обоснование преимуществ индивидуального дозирования аминогликозидов: анализ затрат и эффективности

Николетт А.И.М. ван Лент-Эверс^{1,4}, Рон А.А. Маттьет¹,
Вильям П. Гюс², Бен А. ван Хаут³, Александр А. Винкс¹

- ¹ Лаборатория ТЛМ и клинической токсикологии, Центральный госпиталь Гааги, Гаага, Нидерланды
- ² Отделение интенсивной терапии, госпиталь Лейенбурга, Гаага, и отделение гастроэнтерологии Медицинского центра Лейденского университета, Лейден, Нидерланды
- ³ Институт экспертизы медицинских технологий, Университет Эразма, Роттердам, Нидерланды
- ⁴ Отдел клинической фармакологии, госпиталь Лоренца, Цейст, Нидерланды

Результаты применения основанного на фармакокинетическом моделировании так называемого активного терапевтического мониторинга (АТМ) в клинической практике были проанализированы в проведенном проспективном четырехцентровом исследовании. Процедура АТМ предполагала тесное сотрудничество врачей и сотрудников лаборатории терапевтического лекарственного мониторинга (фармакокинетической лаборатории), активное участие так называемого фармакокинетического сервиса в проводимой антибактериальной терапии — назначение оптимальной терапии с учетом принципов фармакокинетики с самого начала лечения и последующая ее корректировка на основе измерений концентрации препарата в крови пациента и байесовского адаптивного управления. Анализ затрат и эффективности был основан на реальных стоимостях (для простоты изложения будем считать, что стоимость рассчитывалась в условных единицах — в этом исследовании 1 долл. США = 2 у.е. — Прим. переводчика). Группа, получавшая терапию с привлечением АТМ, включала 105 пациентов, группа контроля — 127 пациентов, получавших рутинно проводимую антибактериальную терапию без активного участия фармакокинетического сервиса. У 48 пациентов группы АТМ и 62 пациентов группы контроля инфекция была причиной госпитализации. В группе АТМ пиковые концентрации антибиотика в крови ($10,6 \pm 2,9$ мг/л) оказались статистически значимо выше ($p < 0,01$), чем в группе контроля ($7,6 \pm 2,2$ мг/л). Минимальные концентрации перед следующим введением в группе АТМ были значительно ниже ($p < 0,01$). Была выявлена также тенденция снижения смертности в группе АТМ (9/105) по сравнению с 18/127 в группе контроля ($p = 0,26$), этот показатель оказался значимым для пациентов, имевших инфекцию при госпитализации (1 смерть из 48 пациентов группы АТМ по сравнению с 9 из 62 пациентов контрольной группы; $p = 0,023$). Процедура АТМ снижала ($p = 0,045$) среднюю продолжительность госпитализации ($20,0 \pm 1,4$ дней по сравнению с группой контроля $26,3 \pm 2,9$ дней), а для пациентов, имевших инфекцию при госпитализации, $12,6 \pm 0,8$ дней по сравнению с $18,0 \pm 1,4$ ($p < 0,001$). Доля случаев нефротоксичности была снижена ($p < 0,01$) с 13,4% (в группе контроля) до 2,9% (в АТМ группе). В АТМ-группе средняя стоимость лечения пациента была ниже: 13125 ± 9267 у.е. по сравнению с группой контроля $16\,862 \pm 17\,721$ у.е. ($p < 0,05$), и для пациентов, имевших инфекцию при госпитализации, — 8883 ± 3778 у.е. по сравнению с $11\,743 \pm 7437$ ($p < 0,01$). Таким образом, основанная на фармакокинетическом моделировании индиви-

Nicolette A.E.M van Lent-Evers, Ron A.A. Mathot, William P. Geus, Ben A. van Hout, Alexander A. Vinks «Impact of Goal-Oriented and Model-Based Clinical Pharmacokinetic Dosing of Aminoglycosides on Clinical Outcome: a Cost-Effectiveness Analysis»

Была опубликована в журнале *Therapeutic Drug Monitoring* 21: pp. 63-73, 1999.

Печатается в переводе с разрешения издательства журнала.

дуализация дозирования аминогликозидов позволила повысить эффективность антибактериальной терапии, уменьшить сроки госпитализации, снизить частоту проявлений нефротоксичности, то есть проводимая терапия в сочетании с процедурой АТМ имеет ряд преимуществ с точки зрения эффективности и безопасности по сравнению с рутинно проводимой терапией.

Введение

Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) является относительно молодой клинической дисциплиной, которая сочетает определение концентрации препарата в крови (или плазме) с применением принципов фармакокинетики и фармакодинамики для оптимизации режимов дозирования. Многие клинические лаборатории проводят ТЛМ в той или иной форме, но часто не достаточно активно участвуют в процессе интерпретации получаемых измерений и корректировке проводимой терапии. В настоящее время определение концентрации большинства препаратов с узким терапевтическим диапазоном, таких, например, как аминогликозиды, является рутинным исследованием.

Аминогликозиды высокоактивны в отношении грамотрицательных бактерий и широко применяются в условиях стационара при лечении серьезных инфекций, несмотря на появление новых антибактериальных средств [1, 2]. Терапевтическая эффективность аминогликозидов коррелирует с высокими пиками концентрации препарата в крови. Куммуляция препарата, на которую указывают возрастающие значения минимальных концентраций перед следующим введением, ассоциируется с ото- и нефротоксичностью [3, 4]. Эти соотношения, а также значительная интер- и интраиндивидуальная вариабельность фармакокинетических параметров являются основой для проведения процедуры ТЛМ аминогликозидов [5-8].

Клинические и фармакоэкономические преимущества проведения процедуры ТЛМ в сочетании с положительной ролью фармакокинетического сервиса в клинической практике были продемонстрированы в нескольких исследованиях [9-16]. Тем не менее, несмотря на широкое внедрение в практику ТЛМ аминогликозидов, определенную озабоченность вызывает правильность интерпретации и адекватность использования получаемых измерений. Кроме того, измерение концентрации не является обязательной процедурой при проведении стандартной терапии аминогликозидами в госпитале.

Наша центральная лаборатория проводит ТЛМ для 6 госпиталей Гааги. До организации настоящего исследования предоставляемый фармакокинетический сервис, помимо собственно измерений концентрации препарата, включал рутинно проводимую фармакокинетическую оценку и оптимизацию дозирования только на основе измерений минимальной и максимальной концентраций у пациента с использованием традиционной однокамерной фармакокинетической модели. Рекомендации по корректировке режимов дозирования со-

ласовывались по телефону с врачом, как правило, на основе только имеющихся измерений в ходе мониторинга без сопоставления их с клиническими данными о течении болезни у пациента. Основной целью такой оптимизации обычно был расчет режима дозирования, позволяющий поддерживать концентрации препарата в крови у пациента в принятом для этого препарата среднем диапазоне. Начальный режим дозирования при этом в лучшем случае назначался на основе усредненных номограмм (позволяющих учесть массу тела пациента и его почечную функцию). При необходимости в ходе терапии процедура ТЛМ инициировалась лечащим врачом. Проведенные нами ранее ретроспективные исследования продемонстрировали, что при таком варианте фармакокинетического сервиса результаты ТЛМ недостаточно эффективно используются для оптимизации проводимой фармакотерапии [17, 18]. Данные, собранные в одном госпитале, показали, что 30-50% пациентам, получавшим антибактериальную терапию, включающую аминогликозиды, процедура ТЛМ вообще не назначалась. У мониторируемых же пациентов часто пробы крови брались в неподходящее время, например в самом начале курса терапии или ближе к концу, несмотря на имевшиеся рекомендации измерять уровни препарата по прошествии несколько дней терапии. Поскольку у многих пациентов измеренные значения пиковых концентраций оказывались ниже допустимого уровня 6 мг/л или минимальные концентрации были выше допустимых значений, часто требовались корректировки режимов дозирования. Эти результаты послужили причиной для организации настоящего проспективного 4-центрового клинического исследования для оценки влияния подхода индивидуализации дозирования, основанного на фармакокинетической модели и байесовском адаптивном управлении (активный терапевтический мониторинг — АТМ), на показатели эффекта антибактериальной терапии аминогликозидами [19]. Целью исследования было определение преимуществ активного участия фармакокинетического сервиса по сравнению с обычной практикой назначения терапии аминогликозидами. Анализ затрат и эффективности был выполнен с тем, чтобы оценить, будут ли дополнительные затраты оправданы клиническими и экономическими преимуществами, предоставляемыми новым подходом.

Материалы и методы

Пациенты.

Это мультицентровое проспективное исследование выполнялось в течение 18 мес. (июль 1994 — декабрь 1995 гг.) в терапевтических и хирургических отделениях

ях четырех госпиталей Гааги (600, 580, 400, 400 коек), являющихся клиническими базами медицинских университетов. У всех пациентов подозревалась или была выявлена инфекция, обусловленная грамотрицательной флорой. У некоторых пациентов инфекция была на момент госпитализации, у других — признаки инфекции появилась в период пребывания в стационаре. В исследование включались пациенты старше 18 лет. Гентамицин вводился по меньшей мере в течение 48-часового периода. Иммунологически «скомпрометированные» пациенты, пациенты с тяжелой почечной недостаточностью (оцененный клиренс креатинина $CL_{Cr} < 20$ мл/мин), а также пациенты с кистозным фиброзом в исследование не включались.

Планирование исследования и оценка необходимого числа включенных пациентов основывались на данных работы [11]. На стадии планирования минимально необходимое число пациентов для выявления статистически значимого различия в продолжительности госпитализации между группой АТМ и контрольной группой было оценено как 200 (при условии 5% уровня значимости и вероятности ошибки второго рода $\beta=20\%$). Протокол был одобрен Этическими комитетами всех участвующих в исследовании госпиталей.

Протокол исследования.

Контрольная группа (рутинно проводимая терапия аминогликозидами).

Контрольная группа включала пациентов, получавших терапию гентамицином на первом этапе исследования (июль 1994–март 1995). Начальная доза гентамицина и интервал дозирования назначался врачом интуитивно или на основе усредненных номограмм. Активного вмешательства в этот процесс клинических фармакологов госпиталя не было (отсутствие активного участия фармакокинетического сервиса). Уровни препарата в крови измерялись, если это назначалось врачом, моменты взятия проб крови также определялись врачом. Инструкции по дозированию и взятию проб в моменты времени, соответствующие максимальной и минимальной концентрациям в интервале дозирования, содержались в формулярах по использованию антибиотиков и были известны врачам. Индивидуальные значения фармакокинетических параметров вычислялись методом линейной регрессии на основе традиционной однокамерной фармакокинетической модели [20, 21]. В качестве средних терапевтических диапазонов концентраций использовались значения 6–9 мг/л для пиковых концентраций (измерения через 1 ч после начала инфузии), для минимальных концентраций перед следующим введением верхним пределом считался уровень 2 мг/л. После определения концентрации гентамицина в пробах крови интерпретация измерений и соответствующие рекомендации по корректировке режима дозирования сообщались врачу по телефону.

Группа активного терапевтического мониторинга (АТМ) — активное участие фармакокинетического сервиса.

В этой группе применялась новая стратегия проведения терапии (активное вмешательство фармакокинетического сервиса), при которой врач консультировался с клиническим фармакологом при назначении терапии гентамицином каждому пациенту. Чтобы это стало возможным, клинический фармаколог госпиталя был доступен по телефону в любое время суток. Индивидуально назначаемый режим дозирования предполагал введение нагрузочной, а затем начальной поддерживающей доз, рассчитанных с учетом возраста пациента, его массы тела, почечной функции. При индивидуализации терапии учитывалось, является инфекция генерализованной или локальной или нет, а также клиническая картина, состояние пациента, предполагаемые или выделенные возбудители. Для проведения подобных расчетов на основе популяционного моделирования использовалась программа MW/PHARM (Mediware, Гронинген, Нидерланды [22]). Фармаколог координировал взятие двух проб крови у пациента: обычно в качестве пиковой концентрации гентамицина в крови измерялся уровень сразу после введения нагрузочной дозы (или после поддерживающей дозы — через 30 мин после окончания 30-минутной инфузии), а второй уровень — на следующее утро вместе с другими анализами или непосредственно перед следующим введением препарата. Последующая корректировка индивидуального режима дозирования проводилась на основе полученных измерений с использованием байесовского метода адаптивного управления (MAP — максимум апостериорной вероятности) [19, 22, 24]. В качестве терапевтической цели выбирались различные значения максимальной и минимальной концентраций в соответствии с данными табл. 1. Интерпретация полученных измерений концентрации, рекомендации по корректировке режимов дозирования и советы, касающиеся оптимальных моментов следующих измерений, если таковые были необходимы, сообщались врачу по телефону. Полученные результаты фармакокинетического моделирования сопоставлялись с клиническими данными.

Таблица 1
Заболевания и соответствующие терапевтические цели при терапии гентамицином [1, 2, 7]

Типы инфекции	Пиковая концентрация, мг/л	Минимальная концентрация, мг/л
Пневмония	9–11	1.0–1.5
Сепсис	9–11	1.0–1.5
Мягкие ткани	8–10	1.0–1.5
Простая инфекция мочевыводящих путей	7–8	0.5–1.0
Смешанная инфекция мочевыводящих путей	8–10	1.0–1.5
Возбудитель не выделен	8–10	1.0–1.5

Измерение концентрации препарата

Концентрации гентамицина в крови определялись иммунофлуоресцентным методом (TD_xFL_x-system, Abbott Diagnostics, Чикаго, США).

Информация о пациенте

Для каждого пациента следующая информация регистрировалась в медицинской карте: демографические характеристики (возраст, пол, масса тела, рост, концентрация креатинина в крови), жизненные показатели (давление, температура), рентген грудной клетки, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), лейкоциты и результаты анализа мочи. В карту заносилась информация, объясняющая необходимость назначения терапии аминогликозидами; клиническая история; генерализованная инфекция или ее предполагаемая локализация; возбудитель(и); наличие абсцесса, асцита; сопутствующие заболевания. Данные об индивидуальной фармакокинетике включали величины нагрузочной и поддерживающей доз, интервал дозирования, значения измерений максимальной и минимальной концентраций, оценки индивидуальных значений фармакокинетических параметров (период полувыведения, объем распределения, клиренс). Клинические результаты лечения также мониторировались, при этом регистрировались такие параметры, как продолжительность периода лихорадки, длительность терапии, число дней в интенсивной терапии, проявления ото- и нефротоксичности, продолжительность госпитализации, смерть. Аудиометрия не была стандартной практикой в госпиталях, участвующих в исследовании, и не проводилась рутинно. Проявлением нефротоксичности считалось повышение концентрации креатинина в крови более чем на 40 мкмоль/л во время терапии аминогликозидами по сравнению с исходным значением [11].

Популяционное моделирование

В ходе исследования была рассчитана специфическая для населения Гааги популяционная фармакокинетическая модель поведения гентамицина в организме с помощью непараметрического алгоритма NPEM2 (программа из пакета прикладных программ (п/п) USC*PACK, версия 10.4, Университет Южной Калифорнии, Лос-Анджелес, США [23, 24]). Данные о пациентах (возраст, рост, масса тела, пол, концентрация креатинина в крови, режим дозирования гентамицина, измерения концентрации препарата в крови и соответствующие моменты измерений), собранные во время рутинной процедуры ТЛМ в течение 6 мес. до начала этого исследования были введены в программу USC*PACK и организованы в виде файлов [25]. С помощью параметрического метода (программа IT2B из п/п USC*PACK) были предварительно оценены диапазоны возможных значений фармакокинетических параметров выбранной модели. Затем с помощью программы NPEM2 по имеющимся данным рассчитывалась совместная плотность распределения фармакокинетических параметров модели, представленная в виде 2- и 3-мерных графиков маргинальных плотностей. В расчетах использовалась линейная однокамер-

ная фармакокинетическая модель поведения гентамицина в организме. Константа скорости элиминации (K_E) была представлена в модели как сумма почечной (K_R) и непочечной (K_{NR}) составляющих, почечная составляющая выражалась как функция клиренса креатинина (CL_{CR}). Непочечная составляющая константы скорости элиминации (K_{NR}) оценивалась на основе популяционных данных о соотношении K_E-CL_{CR} с помощью линейной регрессии. Кажущийся объем распределения (V_s) нормировался на массу тела пациента.

Стандартные отклонения ошибки измерений концентрации были оценены в рабочем диапазоне концентраций, соответствующие значения оценок дисперсии ошибки использовались в ходе моделирования для вычисления веса (степени доверия) каждого измерения концентрации [24]. Полином для описания стандартного отклонения (SD) ошибки измерений концентрации гентамицина был представлен в виде:

$$SD = 3,8215 \times 10^{-2} + 1,9715 \times 10^{-2} \times C + 8,3758 \times 10^{-4} \times C^2,$$

где C — концентрация гентамицина в крови.

Полученные оценки коэффициентов полинома были введены в программу NPEM2.

Коэффициент детерминации (R^2) при описании данных изучаемой популяции пациентов выбранной фармакокинетической моделью был оценен как 0,92. Оценки точности прогноза показали, что модель достаточно хорошо приближает имеющиеся измерения и не дает значимой систематической ошибки [26]. В качестве популяционной модели в данном исследовании использовались следующие статистические оценки фармакокинетических параметров [медиана $\pm$ стандартное отклонение [25]]:

$$V_s = 0,2793 \pm 0,0822 \text{ л/кг; } K_R = 0,00244 \pm 0,00158 \\ [\text{ч} \times \text{ед.} CL_{CR}]^{-1}, K_{NR} = 0,0360 \pm 0,0160 \text{ ч}^{-1},$$

$$\text{где } K_E = K_{NR} + K_R \times CL_{CR}.$$

Анализ данных и статистика

Анализ эффективности затрат

Анализ эффективности был выполнен только с учетом прямых затрат. Стоимости были рассчитаны на одного пациента умножением используемых ресурсов на стоимость единицы используемого ресурса. Отдельно были выделены такие статьи расходов, как пребывание пациента в отделении интенсивной терапии (ICU), пребывание пациента в терапевтическом или хирургическом отделении, дополнительные диагностические и терапевтические процедуры (вмешательства). Стоимость одного дня пребывания в отделении интенсивной терапии была оценена как 2400,00 у.е., а стоимость одного дня пребывания в отделении как 661,00 у.е. [27]. Стоимость всех диагностических и терапевтических вмешательств была оценена на основе действующей в Голландии системы возмещения расходов. Отношения

«затраты/эффективность» (С/Е отношение) были вычислены в соответствии с формулой:

$$C/E \text{ отношение} = (C_t - C_p) / (E_t - E_p) = \Delta C / \Delta E,$$

где: C_t — средняя стоимость на пациента в АТМ группе; C_p — средняя стоимость на одного пациента в группе контроля; E_t — среднее значение показателя эффекта на пациента в АТМ группе; E_p — среднее значение показателя эффекта на одного пациента в группе контроля [28].

Затраты на ТЛМ-сервис были оценены как 172,00 у.е. на пациента, включая стоимость дополнительных измерений концентрации и дополнительного времени работы персонала. Для сравнения были приведены соответствующие оценки для затрат на ТЛМ в отсутствие активного фармакокинетического сервиса (63 у.е.). Эффективность была выражена в терминах различий показателей выживаемости и различий в днях жизни (в течение рассматриваемого периода) после окончания лечения и выписки из госпиталя. Последний показатель был выбран вместо традиционно применяемого числа дней в госпитале, поскольку летальные исходы могут влиять на этот показатель и снижать его в группе с более низкими показателями выживаемости. Эффективность затрат выражалась в терминах затрат на дополнительно выжившего и в терминах затрат на дополнительный день жизни после выписки. Здесь также в рамках АТМ-группы и группы контроля выделяются подгруппы пациентов, у которых инфекция была или подозревалась на момент госпитализации (грам-отрицательная флора).

Статистика

Статистическая значимость различий для качественных, или дихотомических переменных (например, появление признаков нефротоксичности), проверялась с помощью χ^2 -теста с поправкой Йетса или точного критерия Фишера. Статистическое сравнение непрерывных количественных переменных в предположении их нормального распределения проводилось с помощью t-критерия Стьюдента или дисперсионного анализа для двух или более групп соответственно и с помощью непараметрического Манна-Уитни U-теста, свободного от предположения о законе распределения. Уровень значимости для каждого сравнения был установлен как 5%. Результаты представлялись в виде: среднее значение $\pm$ стандартного отклонения (SD) (если другой вариант не указан). Анализ выживаемости методом Каплана-Мейера (логранговый критерий) был выполнен для сравнения продолжительности пребывания в госпитале. Анализ данных выполнялся с помощью пакета программ SPSS (версия 7.5.2; SPSS [Benelux BV, Горингем, Нидерланды]).

Неопределенности результатов анализа затрат/эффективности были выражены в рамках так называемого СЕ-плана [29] с помощью эллипсов вероятности или двухмерного расширения концепции доверительных интервалов [28].

Результаты

Информация о 432 пациентах (207 получали терапию с АТМ, 225 — традиционно проводимую терапию) была проанализирована. Из них 232 были включены в исследование. Основной причиной исключения была продолжительность терапии гентамицином менее 48 ч. В контрольную группу было включено 127 пациентов, 105 — в группу АТМ. Пациенты контрольной группы и группы АТМ были равномерно распределены в участвующих в исследовании госпиталях. Распределение пациентов, получавших хирургическое и терапевтическое лечение, в сравниваемых группах также было примерно одинаково: 46 (36%) и 81 (64%) против 39 (37%) и 66 (63%) соответственно. Демографические данные пациентов представлены в табл. 2. В начале терапии между сравниваемыми группами не было статистически значимых различий. Из 232 включенных в исследование пациентов у 48 пациентов АТМ группы и 62 пациентов в группе контроля инфекция (грамотрицательная флора) подозревалась или была выявлена на момент госпитализации. Демографические данные по этим подгруппам мало отличаются от соответствующих значений для сравниваемых групп. Различные инфекции, выделенные возбудители и антибиотики, получаемые в комбинации, приведены в табл. 3. Сравнение этих данных для двух групп с помощью Манна-Уитни U-теста продемонстрировало некоторые различия между двумя группами. В группе АТМ доля пациентов с сепсисом оказалась несколько выше, чем в контрольной группе (27% против 15%, $p < 0,05$) и несколько выше доля пациентов с инфекцией кожи и мягких тканей (14% против 0%, $p < 0,01$). Различий в выделенных возбудителях по группам обнаружено не было. Амоксициллин менее часто применялся в группе АТМ в комбинации с гентамицином по сравнению с контрольной группой (10% против 20%, $p < 0,05$), аналогичный вывод относится и к клиндамицину (1% против 9%, $p < 0,05$).

Полученные оценки индивидуальных фармакокинетических параметров и информация о получаемых режимах дозирования представлены в табл. 4. Статистически значимых различий средних значений фармакокинетических параметров в сравниваемых группах выявлено не было. Средние значения клиренса, объема распределения и периода полувыведения для подгрупп пациентов с инфекцией при госпитализации незначительно отличались от соответствующих значений

Таблица 2
Демографические характеристики пациентов, включенных в исследование

Показатели	Группа АТМ	Контроль	p-значение
Число	105	127	
Пол, % жен	52	47	NS
Возраст, лет	67 $\pm$ 18	67 $\pm$ 17	NS
Масса тела, кг	69 $\pm$ 13	70 $\pm$ 17	NS
Креатинин в крови, мкмоль/л	95 $\pm$ 37	88 $\pm$ 30	NS

Примечание: NS — статистически не значимо.

Число (доля) пациентов с различными инфекциями

Таблица 3

	Группа АТМ	Контроль
Первичный диагноз		
Пневмония	31 (29,5)	31 (24,4)
Сепсис	28 (26,6)	19 (15,0)*
Холангит/холецистит	21 (20,0)	20 (15,7)
Полостная инфекция	10 (9,5)	17 (13,4)
Лихорадка неизвестного происхождения	6 (5,7)	11 (8,6)
Инфекция мочевыводящих путей	6 (5,7)	6 (4,7)
Бактериemia	3 (2,9)	1 (0,8)
Остеомиелит	0 (0,0)	4 (3,2)#
Инфекция кожи и мягких тканей	18 (13,3)	0 (0,0)#
Выделенные микроорганизмы		
<i>E. coli</i>	33 (31,4)	31 (23,2)
<i>K. pneumoniae</i>	11 (10,5)	8 (6,3)
<i>P. aeruginosa</i>	8 (7,6)	18 (14,2)
<i>Enterobacter</i>	6 (5,7)	5 (3,9)
<i>P. mirabilis</i>	1 (0,9)	3 (2,9)
<i>Citrobacter</i>	1 (0,9)	2 (1,6)
<i>H. influenzae</i>	0 (0,0)	2 (1,6)
<i>Acinetobacter</i>	0 (0,0)	1 (0,8)
<i>Moraxella</i>	1 (0,9)	0 (0,0)
Возбудитель не выделен	48 (45,7)	62 (48,8)
Антибиотики, применявшиеся в комбинации		
Цефуроксим	19 (18,1)	33 (26,0)
Ампициллин/амоксиклав	14 (13,3)	31 (24,4)*
Бензилпенициллин	6 (5,7)	10 (7,9)
Амоксициллин-клавулановая кислота	6 (5,7)	5 (3,9)
Цефамандол	4 (3,8)	8 (6,3)
Цефтазидим	4 (3,8)	7 (5,5)
Эритромицин	2 (1,9)	2 (1,6)
Клиндамицин	1 (0,9)	11 (8,7)*
Ципрофлоксацин	0 (0,0)	2 (1,6)
Флуоксациллин	3 (2,9)	5 (3,9)

Примечание: * $p < 0,05$; # $p < 0,01$ (Манна-Уитни U-тест).

в группах. Средние режимы дозирования для обеих групп также представлены в табл. 4. Только 32% пациентов группы контроля получали нагрузочную дозу антибиотика. Статистически значимое различие было получено при сравнении средних нагрузочных доз в двух группах, более высокие нагрузочные дозы, рассчитываемые на основе популяционной модели, были в группе АТМ (группа АТМ — 202 ± 34 мг; контроль — 136 ± 38 мг, $p < 0,001$). Поддерживающие дозы в группе АТМ, рассчитываемые на основе байесовской стратегии адаптивного управления, были значимо выше (АТМ группа — 175 ± 34 мг; контроль — 127 ± 39 мг, $p < 0,001$). Такие режимы дозирования привели к более высоким значениям пиковых концентраций (экстраполированы из проведенных измерений: группа АТМ — $10,6 \pm 2,8$ мг/л; контроль — $7,6 \pm 2,2$ мг/л, $p < 0,001$ [рис. 1]). В группе контроля во время первой процедуры ТЛМ 20% измеренных значений пиковых концентраций оказались ниже 6 мг/л. Активное участие фар-

Средние значения $\pm$ стандартные отклонения значений фармакокинетических параметров и средние режимы дозирования у пациентов, включенных в исследование

Таблица 4

Показатель	Группа АТМ	Контроль ^a	p-значение
Объем распределения, л/кг	$0,25 \pm 0,05$	$0,25 \pm 0,06$	NS
Клиренс, л/ч	$3,3 \pm 1,6$	$3,1 \pm 1,5$	NS
Период полувыведения, ч	$4,2 \pm 1,9$	$4,9 \pm 2,6$	NS
Нагрузочная доза, мг	202 ± 34	136 ± 38	$< 0,001^b$
Поддерживающая доза, мг	175 ± 34	127 ± 39	$< 0,001^b$
Интервал дозирования, ч	19 ± 9	14 ± 5	$< 0,001^b$

Примечание:

^a — Оценки параметров на основе данных о 102 пациентах группы контроля, у которых измерялись концентрации препарата в крови в ходе назначенной процедуры ТЛМ.

^b — Манна-Уитни U-тест.

макокинетического сервиса привело к тому, что начальные значения пиковых концентраций были выше 6 мг/л у всех пациентов в группе АТМ. Достаточно высокие значения минимальных концентраций (> 2 мг/л) наблюдались у 23% пациентов группы контроля, в то время как в группе АТМ неадекватно высокие значения минимальных концентраций были обнаружены только у 3% пациентов. Средний интервал дозирования был значимо длиннее в АТМ группе (19 ± 9 ч против 14 ± 5 ч в группе контроля, $p < 0,001$), что приводило к более низким значениям минимальных концентраций (АТМ группа — $0,7 \pm 0,6$ мг/л; контроль — $1,4 \pm 1,3$ мг/л, $p < 0,001$ [рис. 1]). Значения фармакокинетических параметров и параметров режимов дозирования в подгруппах пациентов, имевших инфекцию при госпитализации, были близки к соответствующим значениям для сравниваемых групп.

В среднем у пациентов контрольной группы первые измерения концентрации гентамицина в крови проводились только через 3,5 дня терапии (1–21-й день). У 25 (19,8%) пациентов этой группы терапия гентамицином проводилась вообще без контроля ТЛМ. В группе АТМ почти у всех пациентов пробы крови брались сразу после первой нагрузочной дозы, а результаты были доступны уже через 12–24 ч после начала терапии. Среднее число измерений концентраций в течение каждого курса терапии было равно 2,5 (2–4) в АТМ группе и 2,2 (0–6) в группе контроля. Корректировка режима дозирования гентамицина на основе полученных измерений концентрации потребовалась у 80,4% пациентов группы контроля и только у 48,6% пациентов группы АТМ ($p < 0,001$).

Значения показателей, отражающих клинические результаты, приведены в табл. 5. Заметна тенденция снижения смертности в группе АТМ. Статистически значимыми ($p = 0,023$) различия показателей смертности оказались для подгрупп пациентов, имевших инфекцию при госпитализации, за 28-дневный период

Таблица 5

Клинические результаты у пациентов, включенных в исследование

Параметр	Группа АТМ	Контроль	p-значение
Длительность госпитализации, дни	20,0 ± 13,7	26,3 ± 31,5	0,045 ^c
Симптомы проявления инфекции, дни	4,8 ± 5,1	3,4 ± 3,8	0,003 ^a
Период лихорадки, дни	2,8 ± 2,4	2,3 ± 2,9	0,024 ^a
Длительность терапии аминогликозидами, дни	5,9 ± 2,9	8,0 ± 4,9	<0,001 ^a
Суммарная доза, мг	1466 ± 1081	1668 ± 1249	0,161 ^a
Доля корректировок доз, %	48,6	80,4	0,016 ^b
Число (доля) пациентов без ТЛМ	0	25 (19,7%)	<0,001 ^b
Изменение креатинина в крови, мкмоль/л	-6 ± 30	25 ± 99	0,007 ^a
Число (доля) пациентов с проявлениями нефротоксичности	3 (2,8%)	17 (13,4%)	0,003 ^b
Смертность — число (доля) пациентов	9 (8,6%)	18 (14,2%)	0,26 ^b

Примечание:

^a — Манна-Уитни U-тест; ^b — точный критерий Фишера;

^c — метод Каплана-Мейера.

госпитализации смертность (доля умерших пациентов) была ниже в АТМ-подгруппе (1 умерший на 48 пациентов) по сравнению с контрольной подгруппой (9 умерших из 62 пациентов).

Средняя продолжительность пребывания в госпитале была статистически значимо меньше ($p=0,045$) в цензурированной выборке выживших пациентов группы АТМ [здесь результаты представлены как среднее ± ошибка среднего (95%-ный доверительный интервал) — Прим. переводчика]: $20,0 \pm 1,40$ (17,2; 22,7) дней по сравнению с контрольной группой $26,3 \pm 2,9$ (20,6; 32,0) дней. У пациентов с инфекцией при госпитализации средняя продолжительность пребывания в госпитале была $12,6 \pm 0,8$ (11,1; 14,1) дней в подгруппе АТМ по сравнению с $18,0 \pm 1,4$ (15,2; 20,7) дней в подгруппе контроля ($p=0,007$). Период пребывания пациентов в госпитале был проанализирован с помощью метода Каплана-Мейера для всех пациентов сравниваемых групп и для подгруппы пациентов, имевших инфекцию при госпитализации (рис. 2). Значительно короче ($p<0,001$) средняя продолжительность терапии гентамицином была в группе АТМ (5,9 (размах 3–17) дней) по сравнению с контрольной группой (8,0 (4–29) дней). Суммарные дозы аминогликозида были сравнимы в обеих группах. Проявлений нефротоксичности было значительно меньше у пациентов АТМ-группы (АТМ-группа — 2,9%; контроль — 13,4%, $p<0,01$). Двум пациентам контрольной группы потребовался гемодиализ (от нескольких дней до недели) из-за возникшей (обратимой) почечной недостаточности, вызванной нефротоксичностью гентамицина. Результаты сравнения долей инцидентов нефротоксичности были схожи в подгруппах пациентов с инфекцией при госпитализации (пациенты АТМ подгруппы — 2,1%; контроль — 11,3%, $p=0,03$).

Стоимость и анализ «затрат/эффективность»

В табл. 6 представлены оценки стоимостей терапии. Видно, что АТМ-подход снижает затраты по сравнению с традиционно проводимой антибактериальной терапией. Так, АТМ значительно снижает затраты на пребывание в отделении интенсивной терапии. В подгруппе пациентов с инфекцией при поступлении в госпиталь АТМ-подход значительно снижает продолжительность пребывания в отделении и относительные стоимости. Поскольку АТМ демонстрирует дополнительные преимущества с точки зрения эффективности и безопасности, отношение «затраты/эффективность» не несет дополнительной информации и не приводится. Различия в выживаемости были оценены как $5,6 \pm 0,17\%$. Различия в днях после выписки были $8,3 \pm 13,6\%$. Неопределенности, возникающие при анализе баланса между затратами и эффектами, демонстрируются на рис. 3. Здесь центры каждого эллипса представляют точечную оценку стоимостей и эффектов. Внешний эллипс представляет собой 2-мерный аналог 95%-ного доверительного интервала, или наименьшую область, где затраты и эффекты находятся с вероятностью 95%. Средний эллипс соответствует области с 50% вероятностью, а внутренний — с 5%-ной вероятностью.

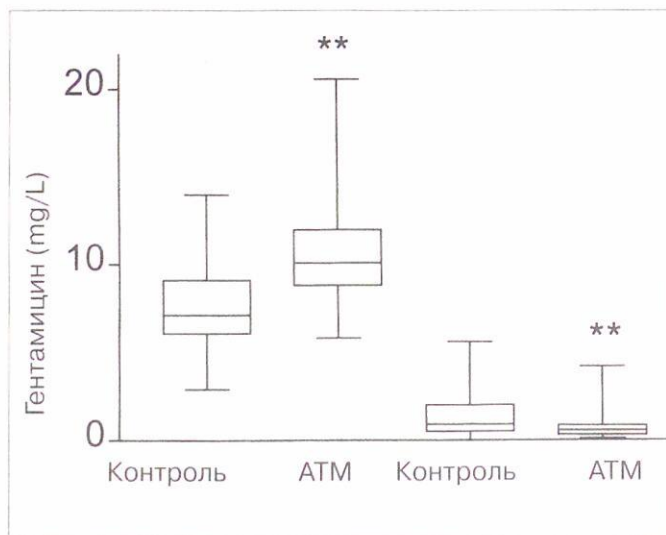


Рис. 1. Представление медианы, 25 и 75-го перцентилей, а также экстремальных значений первых пар измерений концентрации гентамицина в крови по стратегии «пик-спад» для группы контроля ($n=102$ — назначалась процедура ТЛМ) и группы АТМ ($n=105$) соответственно. В качестве максимальных концентраций используются значения, экстраполированные в соответствии с действительным моментом времени измерения предполагаемого пика, в качестве минимальных концентраций (спад) используются измерения перед введением следующей дозы (** $p<0,01$).

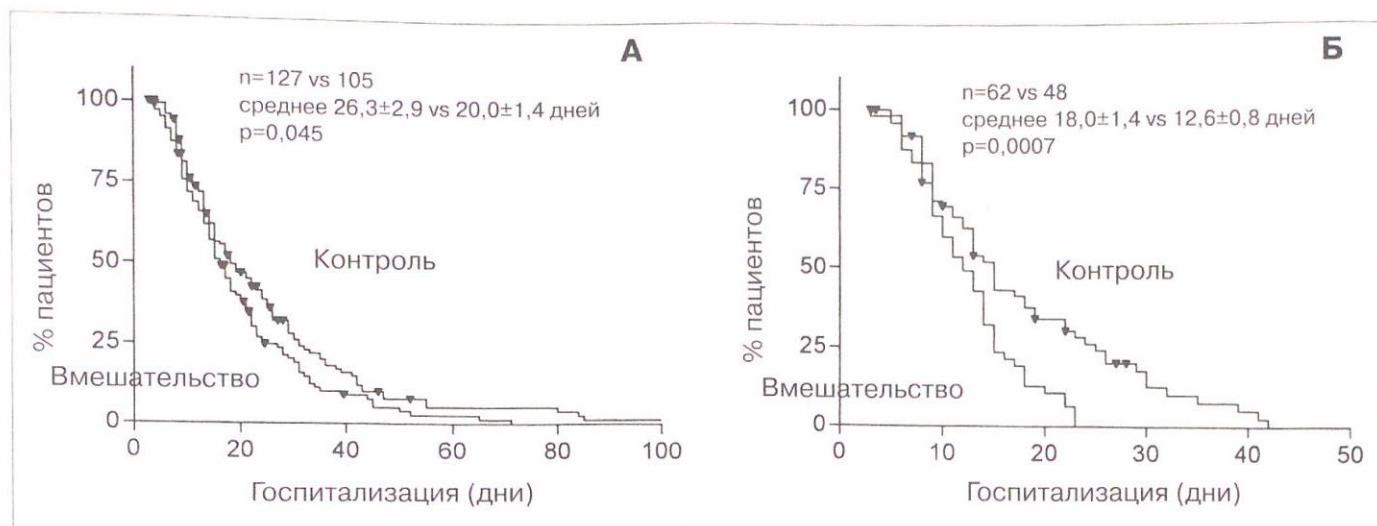


Рис. 2. А – Кривые выживаемости (интересующим событием является выписка из госпиталя), рассчитанные методом Каплана-Мейера, представляют число пациентов (доля), остающихся в госпитале с течением времени (в днях) для группы контроля и группы АТМ; Б – аналогичные кривые, построенные по данным о пациентах, имевших инфекцию при поступлении в госпиталь (грамотрицательная флора) и успешно покинувших госпиталь. n – число пациентов, среднее – среднее время пребывания в госпитале, p – p -значение при сравнении группы АТМ с группой контроля. Событие, представляющее смерть пациента, показано на графике треугольником: 18/127 против 9/105, $p=0,26$ (А); 9/62 против 1/48, $p=0,023$ (Б).

Обсуждение

Представленное исследование показало, что стратегия проведения терапии аминогликозидами, основанная на фармакокинетическом моделировании и адаптивном управлении, позволяет достичь желаемых уровней препарата в крови у пациентов с инфекциями, вызванными граммотрицательной флорой. Активное участие в подборе оптимальных режимов дозирования аминогликозидов фармакокинетического сервиса дает дополнительные клинические преимущества, которые выражаются в снижении смертности, уменьшении длительности госпитализации и частоты проявлений нефротоксичности. В данном исследовании АТМ стратегия позволяла улучшить клинические результаты от проводи-

мой терапии, поскольку в ходе всех консультаций с клиническими фармакологами при рассмотрении физиологических и патологических показателей основным правилом было «лечение пациента, а не уровней препарата в крови». При таком подходе расчет подходящей дозы и интервала дозирования для каждого пациента проводился на основе так называемой индивидуальной терапевтической цели (желаемого диапазона концентраций аминогликозида в крови), корректировка режима дозирования проводилась на основе индивидуального ответа пациента на проводимую терапию, как только такая информация становилась доступна. Если было возможно, повторные измерения концентрации препарата в крови делались через 3-5 дней в зависимости от кли-

Таблица 6

Использование ресурсов и затраты в расчете на одного пациента в группе контроля и в группе АТМ

Использование ресурсов	Стоимость, у.е.					
	Контроль	Группа АТМ	Стоимость в день	Контроль	Группа АТМ	p-значение
Пациенты с инфекцией (грамотрицательная флора) (127 против 105)						
Дни в отделении ^a	22,06	18,33	661	14 578	12 118	0.070
Дней в интенсивной терапии	0,72	0,20	2400	1720	480	0.044
Вмешательства				501	355	0.201
ТЛМ				63	172	0.000
Общая стоимость, (SD)				16 862 (17 721)	13 125 (9267)	0,027
Пациенты с инфекцией при госпитализации (грамотрицательная флора) (62 в группе контроля против 48 в АТМ-группе)						
Дни в отделении ^a	16,26	12,54	661	10747	8290	0.008
Дни в интенсивной терапии	0,23	0,08	2400	542	200	0.266
Вмешательства				392	221	0.121
ТЛМ				63	172	0.000
Общая стоимость (SD)				11743 (7437)	8883 (3778)	0.007

Примечание: ^a – Средняя длительность госпитализации по цензурированной выборке, включающей выживших пациентов.

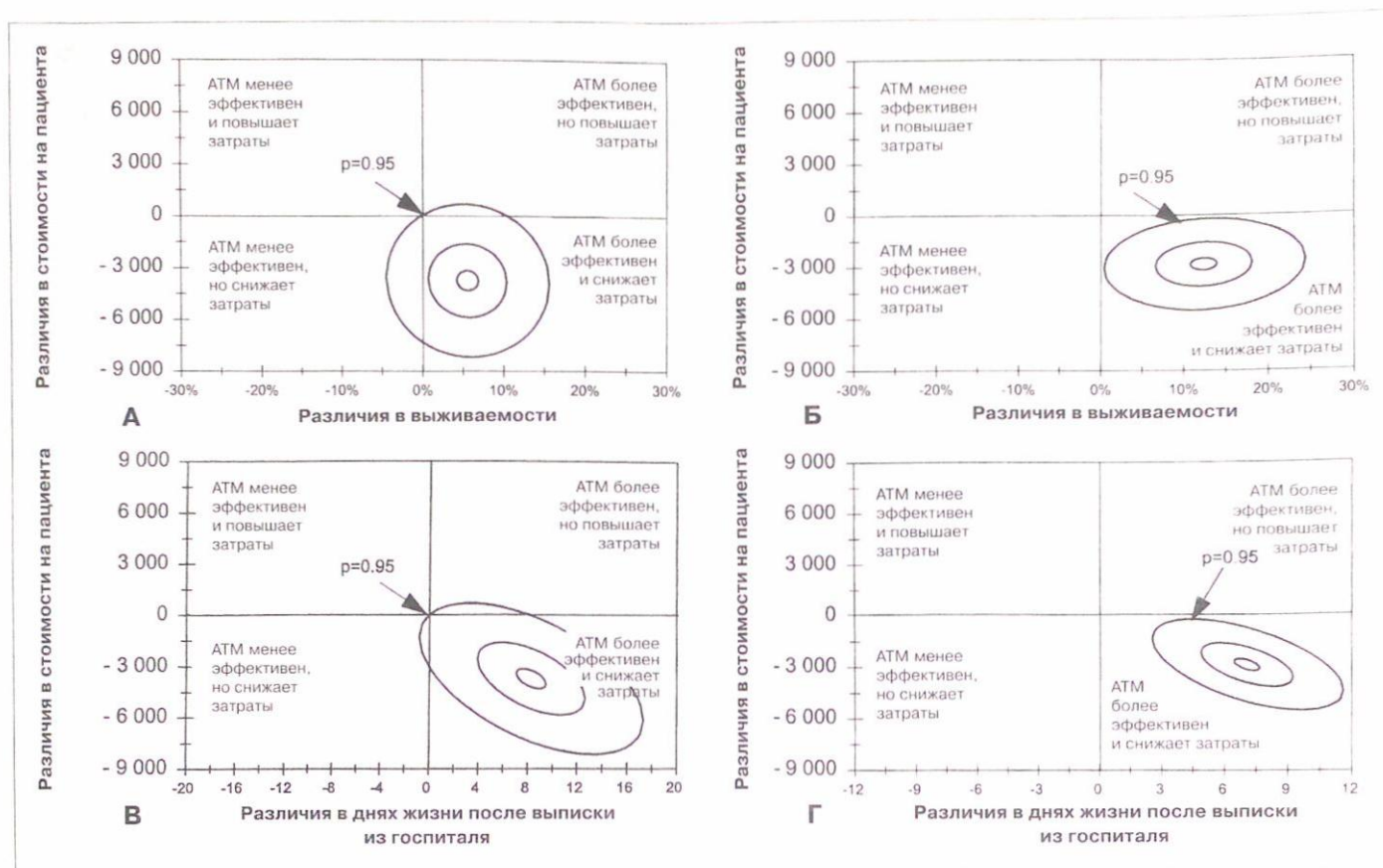


Рис. 3. Соотношение «затраты/эффективность». Дополнительная стоимость (у.е.) на дополнительно спасенную жизнь для всех пациентов, включенных в исследование (А) и для пациентов, имевших инфекцию при поступлении в госпиталь (Б). Стоимость (у.е.) различий в периодах госпитализации для всех выживших пациентов (В) и для выживших пациентов, имевших инфекцию при поступлении в госпиталь (Д). Центры вложенных эллипсов соответствуют точечным оценкам стоимостей и эффектов стандартной терапии (группа контроля) и стоимостей и эффектов АТМ терапии (табл. 6). Вложенные эллипсы внутри отмеченного $p=0,95$ определяют области, содержащие стоимости и эффекты с 95, 50 и 5%-ной вероятностью соответственно.

нического состояния пациента и его реакции на терапию. У всех пациентов в группе АТМ в период проводимой терапии пиковые концентрации препарата в крови были достаточно высокие, выше 6 мг/л, а минимальные не превышали 2 мг/л. Эти результаты сильно контрастируют с полученными в контрольной группе, где, несмотря на возможность применения хорошо известных врачам номограмм для оптимизации режима дозирования гентамицина, как выяснилось, почти все пациенты получали стандартно 120 мг дважды в день вне зависимости от тяжести заболевания и демографических характеристик пациента таких, как масса тела и почечная функция. Исследование также подтвердило вывод [13], что традиционно назначаемые режимы дозирования аминогликозидов создают в крови многих пациентов пиковые концентрации препарата более низкие, чем требуется для успешного лечения инфекции. У 20% пациентов группы контроля пиковые концентрации в начале терапии были ниже допустимого предела (6 мг/л). У 23% пациентов этой группы минимальные уровни оказались выше допустимого предела (2 мг/л). Потенциально нефротоксичные уровни препарата в крови пациентов будут, скорее всего, приводить к росту частоты проявлений нефротоксичности, что и происходило в группе контроля. В группе АТМ назначение оптималь-

ного начального режима дозирования пациенту проводилось на основе рассчитанной специфической для нашего региона популяционной модели, байесовская процедура максимизации апостериорной вероятности использовалась для оценки индивидуальных значений фармакокинетических параметров и последующей корректировки терапии как только измерения концентрации препарата в крови пациента становились доступны. Хотя приложение рассчитанной нами популяционной модели для индивидуализации терапии пациентам другой европейской популяции приводило к лучшим результатам по сравнению с применением для этой цели номограмм, мы рекомендуем пользователям рассчитывать собственную популяционную модель, специфическую для их региона. Это улучшит сбалансированность и точность достижения желаемых терапевтических концентраций. Ответ на вопрос, какой подход лучше использовать для индивидуализации дозирования: непараметрический или параметрический, например нелинейный метод смешанных эффектов (NONMEM), остается за рамками этой работы. Нами был выбран непараметрический метод NPEM2, поскольку известно, что он лучше выявляет клинически значимые субпопуляции пациентов с отличающимися значениями фармакокинетических параметров [19, 26].

В терминах клинической эффективности АТМ стратегия положительно влияет на результаты лечения, что выражается в значимом уменьшении длительности госпитализации. Важно, что такой подход позволил снизить смертность в АТМ группе (9/105 против 18/127 в группе контроля, $p=0,26$), а для пациентов, имевших инфекцию при госпитализации различия были статистически значимыми ($p=0,023$) (1 умерший из 48 пациентов подгруппы АТМ против 9 смертей из 62 пациентов контрольной подгруппы). Хотя можно сказать, что в начале сравниваемые группы были достаточно схожи по многим показателям, ограничения этого исследования связаны в основном с несовершенством его дизайна. Целью было проведение проспективного исследования для демонстрации преимуществ АТМ стратегии. Для получения действительно сравнимых групп пациентов использовался последовательный дизайн, поскольку можно было предвидеть, что проспективная рандомизация приведет к значительной систематической ошибке из-за так называемого «эффекта обучения» врачей, принимавших участие в исследовании.

Тем не менее, можно показать, что сравниваемые группы не были абсолютно идентичны. Наиболее существенное различие касалось числа пациентов с инфекцией кожи и мягких тканей. Кроме того, в АТМ-группе было больше пациентов с сепсисом в состоянии крайней тяжести. В ходе этого исследования не была выявлена связь между длительностью терапии аминогликозидами и диагностированной инфекцией. Для этого, возможно, потребовались бы дальнейшие исследования на основе когортного дизайна с парным контролем. Хотя у пациентов АТМ-группы наблюдался более длительный период лихорадки и период проявлений симптомов инфекции, несмотря на индивидуализацию антибактериальной терапии, эти различия как раз и могут быть объяснены различиями между группами (отличающаяся почечная функция и доля пациентов с сепсисом). Средняя продолжительность пребывания в госпитале была значимо ($p=0,045$) ниже у пациентов АТМ группы ($20,0 \pm 1,4$ дней) по сравнению с контрольной группой ($26,3 \pm 2,9$ дней). Подобные выводы, касающиеся тенденции снижения этого показателя в результате проведения процедуры ТЛМ, содержатся и в работе [30]. Но только несколько проспективных исследований демонстрировали статистически значимое снижение данного показателя как эффект применения ТЛМ [11, 14, 31]. Это может быть объяснено тем, что «длительность госпитализации» не является достаточно чувствительным показателем эффекта для пациентов, у которых инфекция появляется в период пребывания в госпитале. Кроме того, на этот показатель могут влиять и другие, не относящиеся непосредственно к процедуре ТЛМ, факторы, такие как определение состояния «выздоровления» пациента, от которого зависит момент его выписки из госпиталя. В подгруппе пациентов, имевших инфекцию при госпитализации, где причины госпитализации и понятие выздоровления наиболее четкие и определенные, соотношение между применением АТМ стратегии и выз-

доровлением проявилось особенно явно и выразилось в значимом снижении средней длительности госпитализации ($12,6 \pm 0,8$ дней против $18,0 \pm 1,4$ в группе контроля, $p<0,001$).

В нашем исследовании среднее число измерений концентрации препарата в крови во время терапии аминогликозидами было относительно небольшое (группа АТМ – 2,5 против 2,2 в группе контроля) по сравнению с другими исследованиями [11, 12]. Такого небольшого числа измерений оказалось достаточно для успешного применения АТМ-стратегии. На основе АТМ подхода и популяционного моделирования удавалось прогнозировать, а значит, управлять индивидуальным профилем концентрации аминогликозида в крови пациента. Тем не менее, у некоторых пациентов в АТМ группе также наблюдались признаки нефротоксичности гентамицина. Это говорит о том, что при оптимизации терапии должно приниматься во внимание большое число факторов, наряду с измерениями уровня препарата в крови.

Анализ «затрат/эффективность» обычно выполняется для определения, действительно ли дополнительные затраты, связанные с новой терапией или новыми вмешательствами, оправданы их дополнительной эффективностью [28, 32]. Определения стоимостей и эффектов требуют привлечения различных предположений как чисто экономических, так и относящихся к рассматриваемым специфическим медицинским приложениям. Мы пользовались подходом, который позволил также принять во внимание неопределенности, возникающие при оценке отношения «затраты/эффективность». Результаты нашего исследования демонстрируют, что АТМ-стратегия имеет преимущества по сравнению с традиционным способом назначения и корректировки терапии аминогликозидами с фармакоэкономической точки зрения.

Данное исследование было сфокусировано в большей степени на оценку влияния АТМ-стратегии на показатели клинической эффективности, чем безопасности (нефротоксичность) и соответствующую их стоимость. Тем не менее, некоторые данные о стоимости нефротоксичности терапии аминогликозидами были опубликованы ранее [33]. На основе выявленной в этом исследовании частоты проявлений нефротоксичности (13,4% в группе контроля против 2,9% в АТМ группе) и оцененной ранее стоимости нефротоксичности 3 220 долл. США на эпизод [13], можно рассчитать, что АТМ-стратегия потенциально сберегает (3 220 долл. США $\times$ [0,134–0,029] $\times$ 100) приблизительно 33 810 долл. США на 100 пациентов. Кроме того, из двух пациентов контрольной группы, которым потребовался гемодиализ в результате развившейся нефротоксичности гентамицина, один пациент подал иск о халатности медицинского персонала госпиталя. Внедрение в практику АТМ-стратегии могло бы обезопасить госпиталь от подобных исков, а многих пациентов защитить от тяжелых побочных эффектов [34].

Аналогично результатам, представленным в работе [35], наше исследование показало, что достижение же-

лаемых терапевтических концентраций на самых начальных этапах антибактериальной терапии может значительно улучшить клинические результаты. Данное исследование доказывает, что практически все пациенты, получающие терапию аминогликозидами, могли бы иметь дополнительные преимущества при использовании АТМ-подхода, а анализ результатов в

подгруппах пациентов показал, что особенно это относится к пациентам с инфекцией при госпитализации. Для успешного внедрения обсуждаемого АТМ-подхода в клиническую практику необходимо широкое распространение программного обеспечения для фармакокинетического моделирования и индивидуализации дозирования.

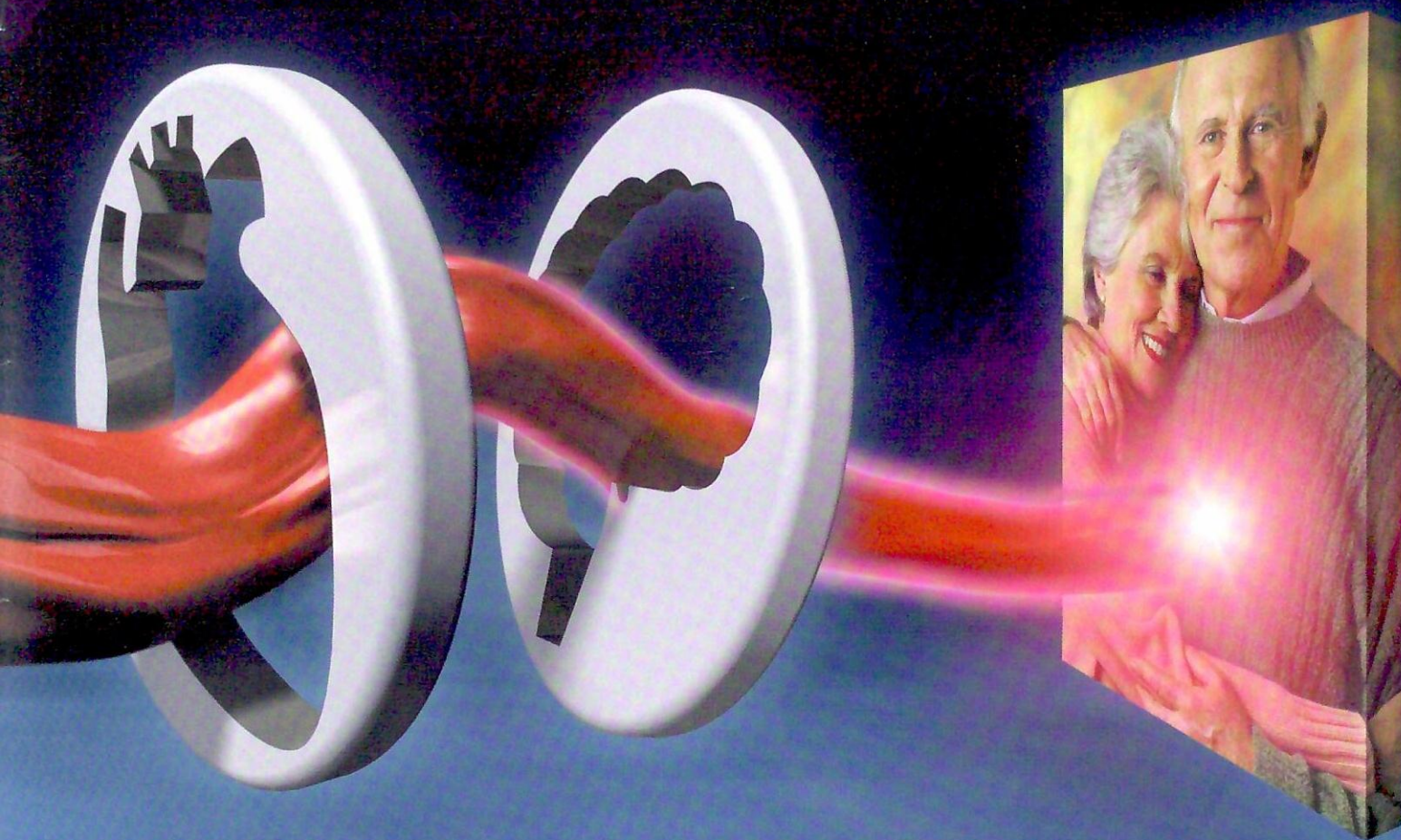
ЛИТЕРАТУРА

- Begg E.J., Barclay M.L. Aminoglycosides – 50 years on. *Br J Clin Pharmacol* 1995;39:597-603.
- Janknegt R., Wijnands W.J.A., Caprasse M., Brandenburg W., Schuitmaker M.G., Stobberingh E. Antimicrobial drug use in hospitals in the Netherlands, Germany and Belgium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:832-8.
- De Broe M.E., Giuliano R.A., Verpoelen G.A. Choice of drug and dosage regimen. Two important risk factors for aminoglycoside nephrotoxicity. *Am J Med (Suppl 6B)* 1986;115-18.
- Verpoelen G.A., Giuliano R.A., Verbist L., Eestermans G., De Broe M.E. Once daily dosing decreases renal accumulation of gentamicin and netilmicin. *Clin Pharmacol Ther* 1989;45:22-7.
- Zaske D.E., Cipolle R.J., Rotschafer J.C., Solem L.D., Mosier N.R. and Strate R.G. Gentamicin pharmacokinetics in 1,640 patients: method for control of serum concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;21:407-11.
- Zaske D.E., Irvine P., Strand L.M., Strate R.G., Cipolle R.J., Rotschafer J. Wide interpatient variations in gentamicin dose requirements for geriatric patients. *JAMA* 1982;248:3122-6.
- Moore R.D., Smith C.R., Lietman P.S. The association of aminoglycoside plasma levels with mortality in patients with gram-negative bacteremia. *J Infect Dis* 1984a;149:443-8.
- Moore R.D., Smith C.R., Lietman P.S. Association of aminoglycoside plasma levels with therapeutic outcome in gram-negative pneumonia. *Am J Med* 1984b; 77:657-62.
- Moore R.D., Lietman P.S., Smith C.R. Clinical response to aminoglycoside therapy: Importance of ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *J Infect Dis* 1987;155:93-9.
- Dahlgren J.G., Anderson F.T., Hewitt W.I. Gentamicin blood levels: a guide to nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 1975;8:58-62.
- Destache C.J., Meyer S.K., Bitner M.J., Hermann K.G. Impact of a clinical pharmacokinetic service on patients treated with aminoglycosides. *Ther Drug Monit* 1990;12:419-26.
- Destache C.J., Meyer S.K., Rowley K.M. Does accepting pharmacokinetic recommendations impact hospitalization? A cost-benefit analysis. *Ther Drug Monit* 1990;12:427-33.
- Bertino J.S., Rodvold K.A., Destache C.J. Cost considerations in therapeutic drug monitoring of aminoglycosides. *Clin Pharmacokinet* 1994;26:71-81.
- Crist K.D., Nahata M.C., Ery J. Positive impact of a therapeutic drug-monitoring program on total aminoglycoside dose and cost of hospitalization. *Ther Drug Monit* 1987;9:306-10.
- Boatman J.L., Zaske D.F., Wertheimer A.L., Rowland C. Individualized gentamicin dosage regimens in burn patients with Gram-negative septicemia: a cost-benefit analysis. *J Pharm Sci* 1979;68:267-72.
- Kimelblatt B.J., Bradbury K., Chodoff L., Aggour T., Mehl B. Cost-benefit analysis of an aminoglycoside monitoring service. *Am J Hosp Pharm* 1986;43:1205-9.
- Vinks AATMM, Touw D.J., Fockens E. The impact of an active laboratory approach on therapeutic drug monitoring. In: Sunshine I (Ed). *Recent developments in Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*. New York Marcel Dekker Inc. 1992;4:19-26.
- Greuell S.E., Van 't Wout J.W., Bijlmer H.A., Horrevorts A.M. Investigation and evaluation of antibiotics use in a general hospital. *Ziekenhuisfarmacie* 1993;9:135-9.
- Jelliffe R.W., Schumitzky A., Bayard D. et al. Model-based, goal-oriented individualized drug therapy. Linkage of population modelling, new ?multiple model? dosage design, Bayesian feedback and individualised target goals. *Clin Pharmacokinet* 1998;34:57-77.
- Sawchuk R.J., Zaske D.E. Pharmacokinetics of dosing regimens which utilize multiple intravenous infusions: gentamicin in burn patients. *J Pharmacokin Biopharm* 1976;4:183-95.
- Touw D.J., Vinks AATMM, Heijerman H.G.M., Bakker W. Validation of tobramycin monitoring in adolescent and adult patients with cystic fibrosis. *Ther Drug Monit* 1993;15:52-9.
- Proost J.H., Meijer D.K.F. MW/PHARM, an integrated software package for drug dosage regimen calculation and therapeutic drug monitoring. *Comput Biol Med* 1992;22:155-63.
- Jelliffe R.W., Gomis P., Schumitzky A. A population model of gentamicin made with a new nonparametric EM algorithm. *Clin Pharmacol Ther* 1991;49:153.
- Jelliffe R.W., Schumitzky A., Van Guilder M. et al. Individualizing dosage regimens: roles of population pharmacokinetics and dynamic models, Bayesian fitting, and adaptive control. *Ther Drug Monit* 1993;15:380-93.
- Jelliffe R.W., Schumitzky A., Van Guilder M. Users manual for version 10.0 of the USC*PACK collection of PC programs. Los Angeles, Laboratory of Applied Pharmacokinetics, University of Southern California, School of Medicine, 1994.
- Evers NAEM, Vinks AATMM. Development of gentamicin population models for ICU and non-ICU patients using a nonparametric algorithm (NPEM). *Ther Drug Monit* 1995;4:424.
- Rutten F.F.H., Van Ineveld B.M., Van Ommen R., Van Hout B.A., Huijsman R. In: *Cost Calculations in Health Care Research. Guidelines for clinical Practice*. Jan van Arkel, Rijswijk, The Netherlands, 1993.
- Van Hout B.A., Al M.J., Gordon G.S., Rutten F.F.H. Costs, effects and C/E ratios alongside a clinical trial. *Health Economics* 1994;3:309-19.
- Black W.E. The CE plane: a graphical presentation of cost-effectiveness. *Medical Decision Making* 1990;10:212-4.
- Ensom M.H.H., Davis G.A., Cropp C.D., Ensom R.J. Clinical pharmacokinetics in the 21st century. Does the evidence support definitive outcomes? *Clin Pharmacokinet* 1998;34:265-79.
- Burton M.E., Ash C.L., Hill D.P., Handy T., Shepherd M.D., Vasko M.R. A controlled trial of the cost benefit of computerized Bayesian aminoglycoside administration. *Clin Pharmacol Ther* 1991;49:685-94.
- Van Hout B.A., Bowman L., Zelinger D.J., Simoons M. Costs and effects in therapy for acute coronary syndromes: The case of abciximab in high-risk patients undergoing percutaneous transluminal coronary angioplasty in the EPIC study. *Am Heart J* 1998;135:1-9.
- Eisenberg J.M., Koffler H., Glick H.A., Connel M.L., Larry E.L., Talbot G.H. et al. What is the cost of nephrotoxicity associated with aminoglycosides? *Ann Intern Med* 1987;107:900-9.
- Brushwood D.B. Government liable for failure to monitor a patient's serum gentamicin concentration in an army hospital. *Am J Hosp Pharm* 1992;49:1748-50.
- Kashuba A.D.M., Nafziger A.N., Drusano G.L., Bertino J.S. Early optimization reduces time to therapeutic response in Gram-negative pneumonia. In: *Proceedings 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. New Orleans, Louisiana, 1996. American Society of Microbiology, Washington, DC.

ПРОРЫВ В АНТИАГРЕГАНТНОЙ ТЕРАПИИ

Плавикс™

КЛОПИДОГРЕЛЬ БИСУЛЬФАТ



Плавикс™ на **26%** надежнее,
чем аспирин, предупреждает такие
атеротромботические события, как
ишемический инсульт, инфаркт миокарда
и сосудистая смерть

* Исследование CAPRIE и мета-анализ Antiplatelet Trialists' Collaboration. Плавикс предупреждает 24 сосудистых осложнения на 1000 пациентов, леченных в течение года, в то время как аспирин - 19, таким образом различие составляет 26%.

sanofi~synthelabo

107045 Москва, Последний переулок, д. 23/3
Тел.: (095) 721-1400 Факс: (095) 721-1411

Беталок®
метопролола сулцинат

30К

сердечно-сосудистых
заболеваний

20 лет успешного
клинического применения

самый популярный
в мире бета-блокатор¹

Беталок®
Метопролола сулцинат

30К

селективный липофильный
антагонист β_1 - адренорецепторов

Препарат выбора для терапии артериальной гипертензии,
ишемической болезни сердца и вторичной профилактики
инфаркта миокарда

Новая лекарственная форма Беталок 30К
обеспечивает дополнительные возможности
в лечении сердечно-сосудистых заболеваний

50 мг - одна таблетка в день - стартовая доза для
лечения артериальной гипертензии

100 мг - одна таблетка в день - стартовая доза для
лечения ишемической болезни сердца

1. IMS Data 1999

AstraZeneca



119021, ул. Тимура Фрунзе, д. 11, корп. 2-5 т: (095)799-56-99, ф: (095) 799-56-98