

Глава 1

ЭТАПЫ СОЗДАНИЯ НОВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

Согласно определению, фигурирующему в Стратегии развития фармацевтической промышленности на период до 2020 г., «Инновационный препарат [инновационное лекарственное средство (ЛС)] — ЛС, активная фармацевтическая субстанция которого защищена патентом и/или запатентованы технологии получения готовой лекарственной формы и/или способа доставки».

При проведении работ по созданию нового ЛС исследователь сталкивается с двумя основными проблемами, вступающими в противоречие: с одной стороны, необходимо получить достаточные, достоверные данные о новом ЛС, при этом, с другой стороны, нельзя подвергать излишнему риску потенциальных пациентов. В связи с этим традиционно первичные исследования по определению фармакологических свойств и потенциальной токсичности новых лекарственных веществ (ЛВ) выполняются не на людях, а с использованием экспериментальных животных и альтернативных биомоделей. Доклинические исследования, выполненные на животных, в значительной степени позволяют гарантировать безопасность клинических исследований и последующего медицинского применения новых ЛС.

Основные этапы создания нового лекарственного препарата.

1. Анализ рынка существующих ЛС и различных источников информации для выявления неудовлетворенной потребности и определения перспективной, потенциально решаемой проблемы.

2. Научно-промышленный поиск способов решения выбранной перспективной проблемы — анализ существующей опубликованной информации по смежным с выбранной проблемой направлениям (оригинальные научные статьи, патенты, монографии и т.д.).

3. Получение перспективного активного ингредиента (ЛВ или комплекса веществ) и разработка оптимальной лекарственной формы — фармацевтические исследования. Следует подчеркнуть, что в последние

годы распространение получили принципы направленного поиска новых ЛВ. Широко стали использоваться методы биологические, геномные и постгеномные технологии поиска новых мишеней действия ЛВ, принципы и методы нанотехнологии в создании новых ЛВ и инновационных лекарственных форм. Постепенно внедряются новейшие принципы «конструирования лекарств» с использованием методов программного компьютерного моделирования, в том числе методы био- и хемоинформатики, консенсусный поиск новых фармакологически активных веществ. В частности, широко используются модели, позволяющие прогнозировать количественные характеристики биологической активности, обычно называемые количественной взаимосвязью структура–активность (от англ. Quantitative Structure–Activity Relationship). Принцип метода подразумевает поиск количественных соотношений структура–активность с использованием математической статистики и компьютерного программного обеспечения для построения моделей, позволяющих по описанию структуры вещества предсказывать его свойства (физические, химические, биологическую активность).

4. Доклинические исследования — включают исследования *in vitro* (от лат. «в стекле», «в пробирке»), подразумевают лабораторные исследования вне живого организма, как правило, с использованием приборов и реактивов, на культурах живых клеток или в бесклеточных моделях; *in vivo* (от лат. «в живом организме»), подразумевают проведение экспериментальных исследований с использованием лабораторных животных, причем на (или внутри) живой ткани и при живом организме; также в последние годы применяется метод *in silico* (от лат. «в кремнии»), что означает компьютерное моделирование биологического эксперимента, происхождение термина от «кремния» связано с полупроводниковыми свойствами данного материала при производстве компьютерного оборудования, и эксперименты на альтернативных биомоделях. В последние годы после получения перспективного активного ингредиента и перед проведением доклинических исследований на лабораторных животных предварительно проводится автоматизированный программный поиск потенциальных видов фармакологической активности *in silico* и исследование биологических свойств на относительно простых объектах, в том числе *in vitro*. При проведении экспериментальных доклинических исследований следует учитывать рекомендации, изложенные в Руководстве по проведению доклинических исследований ЛС (Миронов А.Н., 2012). Классические доклинические исследования включают в себя краткосрочные и долгосрочные исследования. Крат-

косрочные доклинические исследования проводятся не менее 18 мес и включают следующее.

4.1. Фармакологические исследования на экспериментальных животных включают оценку специфической активности ЛВ. Предполагают определение перспективных видов фармакологической активности, дозозависимости проявляемых эффектов, возможных механизмов действия и др. Одним из ключевых требований при фармакологических исследованиях является проведение экспериментов в сравнении с препаратом-эталоном для данного вида активности. Важным условием перспективности активного ингредиента является удовлетворение одному или нескольким критериям: более высокая активность или эффективность по сравнению с препаратом- эталоном, более низкая токсичность и/или более низкая себестоимость производства.

4.2. Токсикологические испытания на экспериментальных животных включают оценку токсичности и опасности активного ингредиента. Рекомендации по проведению токсикологических исследований, в том числе сравнительные преимущества различных методов определения дозы, вызывающей гибель 50% подопытных животных (LD_{50}), подробно изложены в трудах В.Б. Прозоровского, И.В. Саноцкого и других отечественных фармакологов-токсикологов (Саноцкий И.В., 1970, Прозоровский В.Б., 1962, 1980, Сепетлиев Д.А., 1968, Измеров Н.Ф., 1977, Курляндский Б.А., 2002). Методические подходы к определению токсичности и опасности, включая отнесение веществ к классам токсичности, отражены в работах К.К. Сидорова. Токсикологические испытания включают следующие основные этапы:

1) *острая токсичность* предполагает определение летальной дозы (ЛД) и концентраций при различных способах введения (LD_{50} , концентрация, которая при определенном времени экспозиции вызывает гибель 50% подопытных животных), класса опасности и токсичности;

2) *хроническая токсичность* предполагает определение токсичности при длительном введении (период определяется в зависимости от срока планируемого терапевтического назначения вещества), определение специфических патологических изменений в органах и тканях-мишенях, оценка наличия кумулятивного действия и других изменений;

3) установление *специфической токсичности* предполагает определение потенциальных алергизирующих свойств, наличие канцерогенного, мутагенного, эмбриотоксического действия, способности вызывать лекарственную зависимость.

Последующие исследования на экспериментальных животных, так называемые долгосрочные, проводятся еще не менее 5–7 лет для углубленного изучения фармакологических свойств испытуемого активного ингредиента и выявления возможных отдаленных отрицательных эффектов.

Результаты доклинических исследований токсичности и специфической активности являются необходимыми для получения в дальнейшем разрешения на проведение исследований изучаемого ЛС на людях. Для решения вопроса о возможности проведения клинических исследований результаты доклинических исследований и экспертизы вместе с образцом активного ингредиента, проектом протокола клинических исследований и проектом инструкции по медицинскому применению препарата предоставляются в Росздравнадзор.

5. Клинические исследования — исследования на людях включают в себя 4 фазы и в среднем составляют не менее 5 лет. Важнейшим условием адекватности результатов клинических исследований является соблюдение современных требований по организации и планированию клинических испытаний (принципы рандомизации, сравнения, двойного слепого исследования и др.), данные требования широко освещены в специальной литературе (Белоусов Ю.Б., 2000), и в том числе некоторые основные принципы представлены в правилах GCP. Далее приводятся общие сведения о фазах клинических исследований и их краткая характеристика.

I фаза. Первичные испытания нового активного ингредиента (вещества или комплекса веществ) на человеке, как правило, проводятся на небольшом числе здоровых добровольцев (более 100 человек). Цель — провести предварительную оценку переносимости, безопасности активного ингредиента у человека, определить наличие фармакологического действия (в том числе влияние на различные физиологические и биохимические параметры), оценить фармакодинамический и фармакокинетический профиль, провести сравнение для различных лекарственных форм и доз испытуемого активного ингредиента. Ориентировочная длительность испытаний — от 6 мес до 1 года.

II фаза. Исследования на ограниченном числе пациентов (100–500 человек — количество ограничивается из этических соображений). Цель — доказать активность, клиническую эффективность и оценить краткосрочную безопасность активного ингредиента у пациентов с той болезнью или состоянием, для лечения которого испытуемый активный ингредиент предназначен. Оцениваются параметры, сходные с

определенными в I фазе, однако задачей является не только получение дополнительной информации о безопасности активного ингредиента, но и подтверждение его клинической эффективности и дозозависимости проявляемых эффектов. Например, для регистрации нового противоопухолевого ЛС, применяемого у некурабельных больных, может быть достаточно данных II фазы, полученных только лишь на 150 пациентах. Если хотя бы у половины из них увеличилась продолжительность жизни, можно сделать заключение о эффективности нового ЛС и его необходимости. Для общетерапевтических препаратов должны быть получены объективные доказательства их эффективности по сравнению со стандартной (ранее известной) терапией.

III фаза. Испытания на больших и по возможности различных группах пациентов (1000–10 000 человек и более) с целью определить баланс безопасность/эффективность для лекарственных форм активного ингредиента и его общей и относительной терапевтической ценности. Должны быть исследованы профиль и разновидности наиболее часто встречающихся побочных реакций и специфические характеристики препаратов. Если результаты проведенных исследований положительны в соответствии с целями и протоколами испытаний, проводится оформление документов, и при благоприятном решении уполномоченной контролирующей организации препарат может быть официально зарегистрирован и выпущен на рынок.

IV фаза. Постмаркетинговые, пострегистрационные испытания. Ознакомление с новым ЛС врачей и пациентов, сбор данных для изучения долгосрочных эффектов, определения новых показаний к использованию.

6. Регистрация, патентная защита нового ЛС в среднем составляют не менее 5 лет. Патентная защита может быть начата и на более ранних этапах, например патентование активного ингредиента (новой фармацевтической субстанции) может быть осуществлено практически сразу после синтеза нового вещества и получения первичных данных о его фармакологических свойствах.

7. Продвижение на рынок, дистрибуция, логистика. К данному этапу также относят постмаркетинговые исследования и модификацию.

Глава 2

НОРМАТИВНО-ПРАВОВАЯ БАЗА, РЕГЛАМЕНТИРУЮЩАЯ ПРОВЕДЕНИЕ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящее время в РФ существует достаточная нормативно-правовая база, регламентирующая планирование и проведение доклинических и клинических исследований ЛС, осуществление контроля и предоставление отчетности. В соответствии с п. 40 ст. 4 Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении ЛС» под доклиническим исследованием ЛС подразумеваются биологические, микробиологические, иммунологические, токсикологические, фармакологические, физические, химические и другие исследования ЛС путем применения научных методов оценок в целях получения доказательств безопасности, качества и эффективности ЛС. Целью доклинических исследований ЛС является получение научными методами оценок и доказательств их эффективности и безопасности.

2.1. ГОСУДАРСТВЕННЫЕ ВЕДОМСТВА И НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ, РЕГЛАМЕНТИРУЮЩИЕ ПРОВЕДЕНИЕ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В РФ

Основные государственные ведомства, осуществляющие контроль в области обращения ЛС:

- Министерство здравоохранения РФ (Минздрав России) — осуществляет функции по выработке и реализации государственной политики и нормативно-правовому регулированию в сфере здравоохранения, в том числе в сфере обращения ЛС для медицинского применения, включая вопросы организации профилактики заболеваний, фармацевтической деятельности, включая обеспечение

качества, эффективности и безопасности ЛС для медицинского применения, а также по управлению государственным имуществом и оказанию государственных услуг в сфере здравоохранения, включая оказание медицинской помощи, внедрение современных медицинских технологий, новых методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитации.

- Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (Росздравнадзор) с подведомственными организациями — осуществляет контроль за проведением доклинических и клинических исследований ЛС для медицинского применения, контроль результатов доклинических и клинических исследований свойств ЛС на стадии регистрации ЛС. Отдельно следует подчеркнуть, что в настоящее время в РФ существует периодически обновляемый Перечень организаций и учреждений, осуществляющих проведение доклинических исследований ЛС, утверждаемый Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития.
- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ФГБУ «НЦЭСМП») — по заданию Минздрава России проводит экспертизу ЛС для медицинского применения при государственной регистрации, пострегистрационных изменениях и выдаче разрешений на клинические исследования. Экспертиза является обязательным этапом для поступления ЛС в обращение в РФ, т.е. ввоз и вывоз из страны, производство, хранение, продажа, использование ЛС возможны только в случае, если ЛС зарегистрировано Минздравом по результатам проведенных специалистами ФГБУ «НЦЭСМП» экспертиз эффективности, безопасности и качества ЛС (полномочия закреплены в Федеральном законе «Об обращении ЛС» № 61-ФЗ от 12.04.2010).

Основные нормативные документы, регламентирующие проведение доклинических исследований ЛС в РФ:

1. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении ЛС».
2. Приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» (зарегистрирован в Минюсте РФ 13.10.2010 № 18713).
3. Межгосударственный стандарт ГОСТ 33044–2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice — GLP)» (введен в действие Приказом Росстандарта от 20.11.2014 № 1700-ст).

4. Приказ Минздравсоцразвития России от 23 ноября 2011 г. № 1413н «Об утверждении Методических рекомендаций по содержанию и оформлению необходимых документов, из которых формируется регистрационное досье на лекарственный препарат для медицинского применения в целях его государственной регистрации».

5. Межгосударственный стандарт ГОСТ 7.32–2001 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления» (введен постановлением Госстандарта РФ от 04.09.2001 г. № 367-ст).

Более полный перечень актуализированных основных нормативных актов, регламентирующих проведение доклинических и клинических исследований ЛС в РФ, приведен в приложении 1.

2.2. НАДЛЕЖАЩАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ПРАКТИКА (GOOD LABORATORY PRACTICE) – ИСТОРИЯ РАЗРАБОТКИ И ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ

Одним из основных документов, регламентирующих проведение доклинических исследований в РФ, являются Правила GLP в Российской Федерации.

Первый вариант Правил GLP был разработан Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов в 1976 г. и внедрен в качестве нормативного документа этого ведомства в 1979 г. Система методических указаний GLP направлена, с одной стороны, на обеспечение оптимальной организации научного процесса и условий, в которых планируются, выполняются, контролируются, регистрируются доклинические исследования, описываются и хранятся их результаты, с другой стороны, на обеспечение качества лабораторных животных, их оптимальное содержание и соблюдение принципов гуманного обращения с животными. Таким образом, подразумевается, что соблюдение правил GLP позволяет обеспечивать достоверность результатов исследований и их воспроизводимость. Правила GLP определяют методологию и технологию проведения доклинических испытаний, связанных с определением эффективности и безопасности исследуемого вещества.

Правила GLP включают требования:

- к организации испытаний;
- к личному составу исследователей;

- к помещениям, в которых проводятся испытания и содержатся животные;
- к качеству животных, условиям их содержания и кормления;
- к лабораторному оборудованию и его калибровке;
- к испытываемому и контрольному веществу;
- к составлению и проведению подробной стандартной методики экспериментальных работ (СОП — стандартные операционные процедуры) и к порядку проведения испытаний (протокол исследования);
- к регистрации данных и оформлению отчета;
- к службе контроля за качеством испытаний;
- стандартные методики экспериментальных работ.

Идея разработки GLP была поддержана международной Организацией экономического сотрудничества и развития (Organization for Economic Cooperation and Development — OECD). В результате специалисты OECD на основе существовавшего американского документа сформулировали в 1981 г. международные GLP-правила, которые были приняты в виде национальных документов для придания им официального статуса в странах — участницах OECD. Последний пересмотр этих правил, состоявшийся в 1997 г., определил положение о взаимном признании данных испытаний, полученных в соответствии с GLP-правилами, между 29 странами — участницами OECD. Другие страны могут присоединиться к этому соглашению после внедрения GLP в соответствии с разработанными механизмом и процедурой. Процедура внедрения GLP предусматривает не только наличие соответствующего оборудования, помещений и квалифицированного штата исследователей, но также регулярную инспекцию лабораторий, направленную на оценку соблюдения GLP-правил со стороны OECD и существование специального национального учреждения, ответственного за соблюдение GLP. При этом предусматривается регулярная выборочная аудиторская проверка как проводимых исследований, так и деятельности национального учреждения, контролирующего GLP.

В РФ внедрение международных правил GLP произошло на законодательном уровне в 2003 г. — «Правила GLP в Российской Федерации» утверждены в составе приложения к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 № 267. GLP при проведении доклинических исследований в РФ были разработаны в соответствии с Федеральным законом «О лекарственных средствах» № 86-ФЗ от 22.06.1998 (Собрание законодательства Российской Феде-

рации от 29 июня 1998 г., № 26, ст. 3006; от 13 января 2003 г. № 2, ст. 167; от 10 января 2000 г., № 2, ст. 126; от 7 января 2002 г., часть I, № 1, ст. 2) и положением о Министерстве здравоохранения Российской Федерации, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 29.04.2002 № 284 (Собрание законодательства Российской Федерации, 6 мая 2002 г., № 18, ст. 1771).

Цели внедрения GLP в РФ:

- 1) интеграция в мировое сообщество;
- 2) реализация общей тенденции к регламентации и стандартизации различных видов деятельности, предусматривающей достоверность и воспроизводимость ее результатов;
- 3) приведение уровня документированности доклинических исследований в соответствие с международными нормами;
- 4) повышение методического уровня отечественных доклинических исследований ЛС;
- 5) достижение конкурентных преимуществ и отдельных групповых интересов.

В марте 2010 г. в силу вступил национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434—2009 «Принципы GLP», полностью аутентичный принципам GLP/OECD. В результате многолетнего опыта работы НЦБМТ и ряда учреждений РАН уже наработаны основные пакеты СОП и существует база для подготовки новых. Процедура реального внедрения GLP в России сопряжена с целым рядом проблем, важнейшими из которых являются: недостаточное качество лабораторных животных, неполное соответствие материально-технической базы вивариев и профильных лабораторий исследовательских организаций правилам GLP (помещения, оснащение, техническое и метрологическое обеспечение), недостаток квалифицированного персонала. Однако на законодательном уровне требования к организации, планированию и проведению доклинических исследований ЛС, оформлению результатов и контролю качества определяются в РФ правилами GLP. Кроме того, при проведении экспериментальных доклинических исследований, целью которых является государственная регистрация нового ЛС (особенно если планируется его конкурентоспособность на мировом фармацевтическом рынке), требуется соответствие стандартам, предлагаемым OECD, Международным инженерным консорциумом, Международной организацией по стандартизации, Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов.

Согласно Правилам GLP в РФ, доклинические исследования ЛС включают в себя химические, физические, биологические, микробиологические, фармакологические, токсикологические и прочие экспериментальные исследования с целью получения научными методами оценок и доказательств эффективности и безопасности ЛС. Полный текст GLP в РФ представлен в приложении 2.

ПРИНЦИПЫ ПЛАНИРОВАНИЯ И ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. ОБЯЗАТЕЛЬНЫЕ ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЕ ЭТАПЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

Считается, что основными этапами медико-биологического эксперимента являются:

- 1) формулировка рабочей гипотезы;
- 2) определение целей и задач исследования;
- 3) выбор адекватных методов для решения поставленных задач;
- 4) проведение собственно эксперимента;
- 5) получение, статистическая обработка и анализ фактических данных эксперимента;
- 6) формулировка выводов, полученных в результате эксперимента, и определение их соответствия рабочей гипотезе;
- 7) оценка успешности выполнения поставленной цели исследования.

При этом следует подчеркнуть, что проведению медико-биологического эксперимента должны предшествовать обязательные предварительные этапы, от качества проведения которых в значительной мере будет зависеть достоверность полученных результатов.

Основными важными предварительными этапами медико-биологического эксперимента являются: карантинирование, выбраковка, определение исходных средних величин исследуемых показателей, подбор животных в группы, рандомизация.

1. Карантинирование и выбраковка. Обязательным важным условием успешности эксперимента даже при получении животных из специализированного, эпидемически благополучного питомника является прохождение карантина для вновь поступивших особей (см. Карантин

и сроки карантинирования). Период карантина необходим для обеспечения адаптации животных к изменившимся условиям обитания, время карантина следует использовать для приучения животных к экспериментатору и проводимым стандартным манипуляциям. Кроме того, период карантина следует использовать для наблюдений (за общим клиническим состоянием, поведением, потреблением корма и воды и др.) поступивших животных для исключения из эксперимента потенциально больных или особей, не соответствующих условиям эксперимента по каким-либо заданным параметрам (например, по возрасту, массе тела и т.п.). В период карантина рекомендуется осуществить сбор первичных данных, позволяющих характеризовать животных как клинически здоровых: определение массы тела в динамике, температуры тела, частоты дыхательных движений, сердечных сокращений, основных параметров общего и биохимического анализа крови, мочи и др. Животные, расцененные как больные, выбраковываются из опыта, после чего подвергаются лечению или эвтаназии (в зависимости от причины выбраковки и принятых в учреждении стандартных мероприятий в данном случае).

2. Определение исходных величин исследуемых показателей. Даже при наличии известных данных о средневидовых значениях нормы изучаемых показателей считается целесообразным определить их исходные значения в данной конкретной выборке животных. Необходимость данных действий определяется целым рядом причин, важнейшими из которых представляются следующие: значительная принципиальная вариабельность средней видовой нормы для некоторых показателей, сезонная вариабельность, а также возможность отклонений от средних значений в зависимости от пола и возраста животных, условий содержания и кормления, используемой линии животных, их микробиологического статуса и других факторов. Таким образом, наиболее адекватным является сравнение различий не с известной среднестатистической видовой нормой, а с экспериментально установленными значениями именно тех здоровых животных, которые используются при проведении данного планируемого эксперимента. При этом известные значения среднестатистической видовой нормы, например, согласно данным И.М. Трахтенберга (1991), могут быть использованы при первичном подборе в группы для обоснования пригодности животных для эксперимента по критерию уровня их здоровья.

3. Выбраковка особей с показателями, существенно отличающимися от средних значений по группе. Данный этап эксперимента относится

к области статистической обработки первичных данных и предполагает рассмотрение вопроса о необходимости исключения из вариационного ряда полученных цифровых данных тех значений показателя, которые столь существенно отличаются от остальных, что могут являться артефактными. Методики проведения подобных расчетов и правила обработки выборок, содержащих предположительно артефактные значения, представлены в классических монографиях по медико-биологической статистике (Сепетлиев Д.А., 1968, Беленький М.Л., 1963, Гублер Е.В., 1978) и предполагают использование критериев проверки сомнительного наблюдения при различных уровнях значимости.

4. Распределение животных по группам и рандомизация. При подборе животных в группы для проведения экспериментальных доклинических исследований широко используется принцип парных аналогов. Необходимо использовать клинически здоровых животных, однородных по основным анатомо-физиологическим параметрам, т.е. «выровнять» животных в интактных, опытных и контрольных группах по виду, полу, возрасту, массе тела и другим необходимым по условиям эксперимента анатомическим, физиологическим, биохимическим и прочим параметрам. Следует еще раз подчеркнуть, что более предпочтительным является использование линейных животных, так как этот параметр обеспечивает меньшую вариабельность вариационных значений тестируемых показателей и большую точность получаемых результатов.

В подавляющем большинстве экспериментов следует использовать взрослых здоровых животных, ориентируясь на стандартные параметры возраста и массы тела, например:

- мыши массой 18–20 г;
- крысы массой 150–240 г;
- кролики массой 2000–3000 г (масса тела существенно зависит от породы).

Животных, отобранных на предыдущих этапах как пригодных для эксперимента, подвергают процедуре рандомизации, под которой понимают процесс случайного распределения варианта опыта (например, животных) между объектами (например, контрольной и опытной группами). Распределение в случайном порядке не может быть достигнуто путем беспорядочного отбора, так как если в процессе отбора участвует человек, никакая схема отбора не может считаться по-настоящему случайной. В частности, к сожалению, известно из практики, что если у организаторов и участников исследования появляется возможность повлиять на результаты исследования, эта возможность обязательно

будет использована. Задача рандомизации состоит в том, чтобы обеспечить такой подбор варианта (в нашем случае животных), при котором контрольная группа отличалась бы от опытной только методом экспериментального воздействия (например, введением изучаемого ЛВ). Выбор, проводимый человеком, не является случайным в строгом смысле, поскольку на практике он не выбирает одинаково часто те события, которые имеются основание считать равновероятными. Поэтому для того чтобы получить процедуру истинно случайного отбора, следует воспользоваться каким-либо не зависящим от человека методом, например использовать так называемые «таблицы случайных чисел», подробное описание процедуры их использования представлено, например, в работах Д.А. Сепетлиева (1968), или использовать специальные компьютерные программы — так называемые «генераторы случайных чисел». Таблица случайных чисел называется так потому, что числа в ней сгруппированы в случайном порядке, не поддающемся никакой закономерности. Другими словами, в этой таблице десять чисел (от 0 до 9) расположены так, что любому из них обеспечивается возможность появиться в любом месте таблицы. Независимо от того что составление подобной таблицы требует соблюдения ряда правил, в самом распределении чисел нет абсолютно никакого осмысленного порядка, все подчинено случайности, комбинации чисел случайны и неожиданны. В качестве примера (см. приложение 4) представлены таблицы случайных чисел из книги Д.А. Сепетлиева (1968), числа в приведенных таблицах сгруппированы в 10 столбцах, в каждом из которых по 5 чисел.

Методы рандомизации при проведении экспериментов на животных не имеют принципиальных отличий от методов рандомизации при проведении клинических исследований. Например, стандартная процедура рандомизации предполагает присвоение каждому животному порядкового номера (параллельно осуществляется процедура маркировки животных), после чего животных распределяют по группам при помощи специальных методов.

Основные методы рандомизации.

- Простая рандомизация основана на прямом применении таблицы случайных чисел. Числа в таблице случайных чисел сгруппированы таким образом, чтобы вероятность для каждого из однозначных чисел (от 0 до 9) оказаться в любом месте таблицы была одинакова, т.е. обеспечивается равномерное распределение. Крайний левый столбец таблицы представляет собой номера строк, верхняя строка — номера сгруппированных по 5 столбцов. Произволь-

но выбираются начальная точка (пересечение строки с каким-то номером и столбца или столбцов в зависимости от того, сколько знаков должно быть в извлекаемых случайных числах, и направление движения (влево, вправо, вверх, вниз). Количество объектов наблюдения (в нашем случае — животных), которых необходимо рассортировать по группам, определяет, какие числа будут отбираться: при размере группы до 10 объектов наблюдения ($n < 10$) выбирают только однозначные числа; при $n = 10-99$ — двузначные; при $n = 100-999$ — трехзначные и т.д. Например, для распределения 99 мышей в 3 группы выбираем исходную точку на пересечении произвольной строки и двух соседних столбцов, а также направление движения. Выбираем двузначные числа. Встретив числа 1–33, разместим очередное животное в первую группу, числа 34–66 — во вторую группу, 67–99 — в третью группу. Для распределения на две группы можно действовать следующим образом: встретив четные номера, отправлять очередное животное в первую группу, а нечетные — во вторую. Однако такой метод может привести к формированию различных по численности групп, что является его существенным недостатком.

- Метод последовательных номеров лишен вышеуказанного недостатка. Каждому объекту наблюдения (животному) присваивают номер, являющийся случайным числом из таблицы случайных чисел. Затем эти номера ранжируются в порядке возрастания и в соответствии с выбранным правилом животные распределяются по группам. Например, для распределения на две группы (контрольную и опытную): четные номера в ранжированном ряду — первая группа, нечетные — вторая. Однако число объектов наблюдения в группах уравнивается только к концу процедуры рандомизации.
- Метод адаптивной рандомизации поддерживает равное число объектов наблюдения в группах в течение всей процедуры рандомизации. В общем виде такая процедура предполагает следующее: в начале эксперимента животные распределяются равномерно, затем перед тем как определить, к какой группе отнести очередное животное, оценивается численность уже созданных на данный момент групп. Если численность групп одинакова, экспериментальное воздействие (например, введение изучаемого вещества) распределяют равномерно; если численность одной из групп превосходит другую, вероятность попасть в эту группу снижается.

- Метод блочной рандомизации характеризуется обеспечением высокой сохранности равной численности групп в течение всего процесса рандомизации. Объекты наблюдения, которые предполагается включить в исследование, условно разделяют на равные блоки. В пределах блока методы экспериментального воздействия распределяются так, чтобы воздействию разных методов подвергалось одинаковое число объектов наблюдения, но последовательность назначения экспериментального воздействия была бы различной. Затем блоки случайно распределяют, например пользуясь таблицей случайных чисел.
- Метод стратификационной рандомизации применяется для повышения эффективности рандомизации и улучшения однородности групп. Метод применяется в основном при проведении клинических исследований, однако его можно адаптировать и для экспериментальных доклинических исследований. При этом по основным прогностическим признакам формируются однородные группы (страты). Для каждого конкретного экспериментального воздействия выбираются прогностические факторы, связанные как с моделью (например, с заболеванием), так и с особенностями объекта наблюдения (например, концентрация глюкозы в крови). После поступления сведений об очередном объекте исследования и определения его стратификационной группы по выбранной схеме распределяются методы экспериментального воздействия. Схемы распределения экспериментального воздействия в пределах группы могут быть аналогичны предложенным ранее, например можно использовать переменную последовательность двух вариантов экспериментального воздействия (например, введение одного и того же изучаемого вещества с двумя различными вариантами кратности его введения в течение суток) и назначать их объектам исследования, поступающим в случайной последовательности.

3.2. ПРИНЦИПЫ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ

Одним из важнейших требований к научно-исследовательским работам медико-биологического профиля, в том числе по специальности 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология», является необходимость адекватной статистической обработки фактических экспериментальных данных. Однако следует отметить, что именно в работах медико-биологического профиля типичными ошибками являются не-

корректное применение известных статистических методов и неправильное планирование эксперимента, не позволяющее применить адекватные статистические методы, в результате чего статистический анализ полученных данных выходит за рамки достаточности для получения научно обоснованных выводов и положений (Новиков Д.А., 2005).

Статистическая обработка данных эксперимента должна осуществляться известными общепринятыми методами медико-биологической статистики. В начале планирования эксперимента статистическими методами проводится проверка отсутствия межгрупповых различий (например, в интактной, контрольной и опытных группах). Целью данного этапа является определение равномерного, случайного распределения животных во всех экспериментальных группах по всем изучаемым показателям. Кроме того, абсолютно ясным представляется, что методы медико-биологической статистики используются и для обработки полученных первичных цифровых данных эксперимента.

В настоящее время становится все более актуальным корректное применение статистических методов при планировании и обработке данных биомедицинских исследований. Статистические методы анализа помогают извлечь информацию из данных и оценить качество этой информации. Именно методы статистики позволяют выявить и охарактеризовать закономерности распределений, связей и зависимостей объектов или процессов.

Использование методов медико-биологической статистики позволяет решать следующие основные задачи:

- 1) планирование необходимых объемов выборок;
- 2) описание полученных фактических данных эксперимента (описательная статистика);
- 3) анализ сходства/различий изучаемых объектов или параметров;
- 4) анализ зависимостей между различными характеристиками показателей или объектов;
- 5) выдвижение научных гипотез (в том числе изучение структуры объекта исследования и его признаков, графическое представление данных и результатов их анализа, построение моделей явлений, проверка статистических гипотез);
- 6) статистическая проверка правильности выдвинутых научных гипотез.

В последние годы в статистике все большее распространение получают методы, предполагающие использование одно- или многофакторного дисперсионного анализа, непараметрические методы оценки

сходства/различий двух групп наблюдений (например с использованием статистических критериев Крамера–Уэлча, Вилкоксона–Манна–Уитни, критерия χ^2 , Фишера), оценки связи между двумя рядами наблюдений (корреляционный анализ) и отнесения наблюдений к одному из двух классов, методы для построения классификации и прогноза (дискриминантный анализ, кластерный анализ) и др. методы. Описанию данных методов посвящено множество подробных классических руководств и монографий по медико-биологической статистике таких ученых, как Д.А. Сепетлиев, М.Л. Беленький, В.Ю. Урбах, Е.В. Гублер и др. (Урбах В.Ю., 1975, Сепетлиев Д.А., 1968, Беленький М.Л., 1963, Гублер Е.В., 1978), и некоторые современные издания (Платонов А.Е., 2000, Гайдышев И., 2001, Новиков Д.А., 2005).

Существует также ряд руководств для начинающих исследователей, из которых особенного внимания заслуживает ставшая уже бестселлером книга-учебник Стентона Гланца «Медико-биологическая статистика» (Гланц С., 1999). В связи с вышеизложенным нецелесообразно кратко рассказывать о статистических методах в объеме данной книги. Следует лишь напомнить о высочайшей значимости правильной статистической обработки данных, так как результаты многих медико-биологических экспериментов, осуществленные с использованием неверно выбранных и использованных статистических методов (например, неправомерно широкое использование критерия Стьюдента), способны только ввести в заблуждение.

Следует подчеркнуть, что значительное упрощение и снижение трудоемкости процедуры статистической обработки первичных данных может быть достигнуто при помощи специальных программ для персонального компьютера. Например, одной из самых широко используемых лицензионных программ является STATISTICA (пакет прикладных программ, фирма StatSoft Inc., США), представляющая собой универсальную интегрированную систему, предназначенную для статистического анализа и визуализации данных, управления базами данных и разработки пользовательских приложений, содержащая широкий набор процедур анализа для применения в любой сфере, в том числе в научных исследованиях. Помимо общих статистических и графических средств, в системе имеются специализированные модули для проведения биомедицинских исследований, решения различных задач, например карты контроля качества, анализа процессов и планирования эксперимента.

3.3. ВАЖНЕЙШИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ЭКСПЕРИМЕНТАМ ПО ОЦЕНКЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ВЕЩЕСТВА

1. Эксперименты по оценке специфической активности изучаемого активного ингредиента (вещество, сумма веществ, экспериментальный препарат) проводятся, как правило, как минимум в 3 группах, одна из которых является интактной (например, здоровые животные, без каких-либо тест-воздействий — показатели используются как параметры нормы), другая группа является контрольной (например, животные, подвергнутые тест-воздействию, но без «лечения»), третья группа — опытная (животные, подвергнутые тест-воздействию и введению изучаемого активного ингредиента).

2. Для получения статистически достоверных сведений количество тест-объектов в каждой экспериментальной группе, как правило, должно составлять не менее чем 7–10, при этом в случае использования мелкопитающих половину животных обычно должны составлять самцы, вторую половину — самки.

3. Оценка специфической активности изучаемого активного ингредиента должна проводиться в сопоставлении с известным «препаратом сравнения» (синоним — референтный препарат), т.е. препаратом такой же направленности действия, например из той же фармакотерапевтической группы, а при возможности и из той же химической группы веществ. Целесообразно также проводить сравнительную оценку влияния на изучаемый параметр со здоровыми животными (интактной группы) и/или по сравнению с исходными параметрами этой же группы животных до момента модельного тест-воздействия.

4. Изучаемый активный ингредиент должен быть испытан, как минимум, в 3 дозах, первая из которых должна являться максимально близкой к предполагаемой терапевтической дозе, вторая — предполагаемой максимально переносимой дозой, третья — промежуточной между ними. Дозы рассчитываются в соответствии с ранее определенной величиной LD_{50} (обычно не более $1/10 LD_{50}$).

5. Следует изучить специфическую активность, как минимум, для 2 способов введения активного ингредиента, один из которых должен соответствовать предполагаемому оптимальному для клинического применения.

6. По меньшей мере на одной из моделей оценки специфической активности следует построить кривую доза-эффект, определить дозу,

вызывающую эффект у 50% животных (ED_{50}), рассчитать значения терапевтического индекса, определить время начала действия и длительность проявляемого эффекта при оптимальном для клинического применения способе введения.