








П.В. Шадрин ✉ 
Л.В. Симутенко 
Т.А. Батуашвили 
Н.П. Неугодова 
Е.О. Чечетова 

Определение биологической активности инсулина и его аналогов на животных

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Шадрин Павел Валерьевич; shadrin@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

В последние годы появилась тенденция приравнивать результаты испытаний инсулина физико-химическими методами к его биологической активности. Однако следует подчеркнуть, что об эффективности препаратов инсулина можно судить только по реакции целостного организма, т.е. по гипогликемическому действию, которое является интегральным показателем. Определение биологической активности инсулина особенно актуально в связи с появлением на фармацевтическом рынке биосимиляров, которые практически не являются аналогами оригинальных препаратов. Испытаний только физико-химическими методами для оценки эффективности препаратов инсулина недостаточно. В настоящее время биологическую активность определяют путем испытаний на кроликах. При этом согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) для определения данного показателя также предложена альтернативная методика испытаний на мышах. В связи с физиологическими особенностями мышей для проведения адекватного испытания особое внимание следует уделять подбору исследуемых концентраций инсулина. **Цель работы:** предложить рекомендации по выбору диапазона концентраций инсулина для определения его биологической активности на мышах с учетом изменения чувствительности животных в зависимости от сезона. **Материалы и методы:** проведен анализ результатов испытаний биологической активности инсулина на мышах-самках с учетом аналитической области методики, указанной в ГФ РФ. При подборе концентраций вводимых проб учитывали чувствительность животных в конкретный временной период. **Результаты:** продемонстрировано, что реакция мышей-самок на инсулин в диапазоне концентраций 0,03–0,3 МЕ/мл характеризуется статистически значимой дозозависимостью и линейностью, что позволяет рекомендовать данный диапазон в качестве ориентировочного для определения биологической активности инсулина на мышах-самках. Приведены конкретные примеры, иллюстрирующие подбор концентраций испытуемых растворов. **Выводы:** предложен методический подход к выбору концентраций инсулина и оценке правильности результатов испытания при определении биологической активности двойным перекрестом на мышах-самках.

Ключевые слова: инсулин; биологическая активность; мыши; дисперсионный анализ; диапазон концентраций

Для цитирования: Шадрин П.В., Симутенко Л.В., Батуашвили Т.А., Неугодова Н.П., Чечетова Е.О. Определение биологической активности инсулина и его аналогов на животных. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2022. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-403>

P.V. Shadrin 
L.V. Simutenko 
T.A. Batuashvili 
N.P. Neugodova 
E.O. Chechetova 

Determination of the Biological Activity of Insulin and Its Analogues in Animals

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

✉ Pavel V. Shadrin; shadrin@expmed.ru

ABSTRACT

In recent years, there has been a tendency to equate the results of insulin testing by physicochemical methods with its biological activity. However, it should be emphasised that the effectiveness of insulin preparations can be judged only by the reaction of the whole organism, i.e. by the hypoglycaemic action, which is a composite indicator. The determination of the biological activity of insulin has become especially relevant with the pharmaceutical market entry of insulin biosimilars, which are practically not analogous to the original medicinal products. The effectiveness of insulin products cannot be adequately evaluated using only physicochemical testing. At present, the biological activity of insulin is tested in rabbits. Additionally, the State Pharmacopoeia of the Russian Federation includes an alternative method to determine this parameter using mice. Owing to the physiological characteristics of mice, an adequate test would require special attention to the selection of test concentrations of insulin. **The aim of the study** was to offer recommendations for choosing the range of insulin concentrations for determining its biological activity in mice with due consideration of changes in their sensitivity depending on the season. **Materials and methods:** the authors analysed the results of testing the biological activity of insulin in female mice, bearing in mind the analytical range of the method specified in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Test concentrations of insulin were selected taking into account seasonal shifts in insulin sensitivity of the animals. **Results:** the study demonstrated significant dose dependence and linearity of the responses of female mice to insulin in the concentration range of 0.03–0.3 IU/mL. Therefore, this range can be recommended as a guideline for determining the biological activity of insulin in female mice. The selection of test concentrations is illustrated with specific examples. **Conclusions:** the authors offer a methodological approach to the selection of insulin concentrations and the assessment of the validity of test results during biological activity determination using twin-crossover tests in female mice.

Key words: insulin; biological activity; mice; analysis of variance; concentration range

For citation: Shadrin P.V., Simutenko L.V., Batuashvili T.A., Neugodova N.P., Chechetova E.O. Determination of the biological activity of insulin and its analogues in animals. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. Regulyatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2022. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-403>

Введение

Инсулин — гормон, обладающий гипогликемическим действием, впервые был выделен из поджелудочной железы крупного рогатого скота в 20-х годах прошлого века. Получаемый препарат, на тот момент обладавший низкой активностью, был нестабилен и загрязнен различными примесями; несмотря на это, его сразу стали использовать в медицинской практике для лечения сахарного диабета [1]. Однако для правильного назначения лечебных доз необходимо знать биологическую активность инсулина, которую не удавалось количественно оценить из-за отсутствия подходящей модели

животных, стандартного образца (СО) и условий определения.

В результате многолетней работы исследователей разных стран, приведшей к созданию стабильного СО инсулина, были разработаны сначала простой, а затем двойной перекрестный метод определения биологической активности инсулина, включенные в ведущие фармакопеи мира¹. Метод основан на модели параллельных линий, в которой сравнивают реакцию тест-объектов (кролики или мыши) на введение двух или более доз стандартного и испытуемого образцов.

¹ British Pharmacopoeia. London: H.M. Stationery Office; 1980.

В настоящее время препараты инсулина получают с помощью биотехнологического синтеза. В полном объеме предсказать биологическую активность и клинические эффекты этих препаратов возможно только в исследованиях на животных или, частично, в исследованиях *in vitro* [2].

В последние годы появилась устойчивая тенденция к сокращению использования животных для контроля качества и экспертизы лекарственных средств в соответствии с концепцией 3 R. В настоящее время в Фармакопее США в монографиях на лекарственные средства инсулина для оценки биологической активности используют, как правило, упрощенный метод: биоидентичность², а для рутинного контроля лекарственных средств инсулина используют хроматографические методы и по результатам исследования судят об «активности» препарата, причем выражают эти результаты в международных единицах действия, что допустимо только при определении биологической активности.

«Биологическая активность – особая способность или свойство препарата оказывать определенный биологический эффект»³, т.е. характеризует фармакологическое действие лекарственного средства.

Задача физико-химических методов оценки качества – подтвердить первичную и вторичную структуру действующего вещества, а также количество белка, выраженное в единицах массы. Однако данные методы не дают полной информации о конформации белка, от которой зависит биологическая активность, что особенно важно при контроле биосимиляров [3].

Определение величины биологической активности инсулина *in vivo* проводят в сравнении с аттестованным СО (в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) – с международным СО, фармакопейным СО или СО производителя). В этом случае полученная величина биологической активности отражает основное фармакологическое действие инсулина на организм. Определение качества биотехнологических лекарственных средств, в частности инсулина, требует совместного применения биологических и физико-химических методов, что позволяет получать наиболее полную

информацию [4]. Поэтому определение показателя «Биологическая активность» на кроликах или мышах остается важным элементом фармакопейного анализа.

В ГФ СССР X издания впервые был введен метод простого перекреста на кроликах⁴, а в дальнейшем для повышения точности – метод двойного перекреста (общая фармакопейная статья (ОФС) 42-0009-02). В этой же ОФС впервые в России были регламентированы испытания на мышах, по аналогии с требованиями Британской фармакопеи.

Методика определения активности инсулина на мышах введена в ГФ РФ значительно позже, чем на кроликах, и поэтому не так широко используется контрольными службами, хотя по точности и эффективности не уступает ей. Как показала практика, определение биологической активности инсулина на мышах вызывает некоторые затруднения у исследователей, поэтому для его успешного освоения и проведения испытаний полезны дополнительные методические рекомендации. В частности, это касается выбора концентрации инсулина для проведения испытания, зависящего от чувствительности животных. На чувствительность могут влиять различные факторы, включая линию, пол и условия содержания на момент проведения испытания. Изложенный в статье материал получен на мышах-самках, так как их чувствительность к инсулину значительно выше, чем у самцов.

Кормление и условия содержания животных в виварии, а также время проведения испытаний достаточно стабильны. Однако нельзя не учитывать внешние факторы, например сезонные, которые могут активно влиять на обменные процессы, протекающие в организме животных [5]. При подборе концентраций инсулина для проведения испытания в конкретное время года следует руководствоваться аналитической областью методики, указанной в ОФС.1.2.4.0001.15 (Метод В «Определение биологической активности инсулина по снижению концентрации глюкозы в крови мышей»).

Цель работы – предложить рекомендации по выбору диапазона концентраций инсулина для определения его биологической активности на мышах с учетом изменения чувствительности животных в зависимости от сезона.

² United States Pharmacopeia. USP 43–NF 38. 2021.

³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

⁴ Государственная фармакопея СССР. X изд. М.: Медицина; 1968.

Материалы и методы

Испытания проводили в соответствии с требованиями ОФС «Биологические испытания инсулина»⁵. В испытаниях использовали самок белых мышей массой тела 22–25 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария⁶. Методический подход к выбору концентраций инсулина показан на материале 80 испытаний, проведенных в рамках рутинного контроля препаратов инсулина и его аналогов (в дальнейшем «инсулина»), выполняемых методом двойного перекреста в течение нескольких лет. Проанализированы данные, характеризующие реакцию мышей на введение в холку стандартных образцов инсулина разных концентраций (объем инъекции 0,3 мл, время взятия крови 40 мин после инъекции, четыре группы по 12 животных в каждой). Содержание глюкозы в крови отражало реакцию мышей на введение стандартных образцов инсулина в малых и больших концентрациях в первый и второй день испытания. Оценку реакции животных на введение инсулина различных концентраций проводили в сравнении с контрольной группой, которая получала аналогичный объем растворителя: подкисленного раствора натрия хлорида 0,9% для инъекций.

Результаты и обсуждение

Полученная зависимость средней концентрации глюкозы в крови мышей-самок от концентрации введенного инсулина представлена в таблице 1 и на рисунке 1. Для линеаризации данных графическая зависимость построена в логарифмических координатах.

Согласно полученным данным (табл. 1, рис. 1) внутри каждого из трех диапазонов: 0,03–0,05, 0,06–0,12 и 0,25–0,30 МЕ/мл средние значения ответов животных на инсулин практически одинаковы. Так как модель параллельных линий подразумевает использование дозозависимых и линейных данных, для правильного анализа зависимости, представленные данные целесообразно объединить в три группы (табл. 2, рис. 2).

Для демонстрации линейности и дозозависимости реакции животных провели дисперсионный анализ [6] (табл. 3). При этом вычисляли значения нескольких источников дисперсии (показателей), два из которых («Регрессия» и «Нелинейность») являются основными и характеризуют дозозависимость и линейность соответственно.

Дисперсионный анализ показал дозозависимость и линейность реакции мышей на инсулин

Таблица 1. Концентрация глюкозы в крови мышей-самок в ответ на введение инсулина различных концентраций

Table 1. Blood glucose concentrations in female mice after administration of different concentrations of insulin

Концентрация инсулина, МЕ/мл <i>Insulin concentration, IU/mL</i>	Число животных в группе (n) <i>Number of animals in the group (n)</i>	Средняя концентрация глюкозы в крови животных и полуширина доверительного интервала ($\bar{c} \pm \Delta\bar{c}$), мг% (P = 99%) <i>Average blood glucose concentration in the animals and confidence interval half-width ($\bar{c} \pm \Delta\bar{c}$), mg% (P = 99%)</i>
0*	24	133,76 ± 5,26
0,03	158	101,22 ± 3,74
0,04	95	98,10 ± 5,22
0,05	150	104,72 ± 3,74
0,06	48	89,53 ± 5,17
0,07	148	88,71 ± 3,94
0,09	144	86,55 ± 3,95
0,12	68	83,25 ± 5,92
0,25	150	71,38 ± 3,31
0,27	47	72,18 ± 4,86
0,30	71	66,19 ± 4,14

* Животным контрольной группы вводили соответствующее количество подкисленного физиологического раствора.

* Control animals were injected with the appropriate amount of acidified saline.

⁵ ОФС.1.2.4.0001.15. Биологические испытания инсулина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁶ СП 2.2.1.3218-14. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

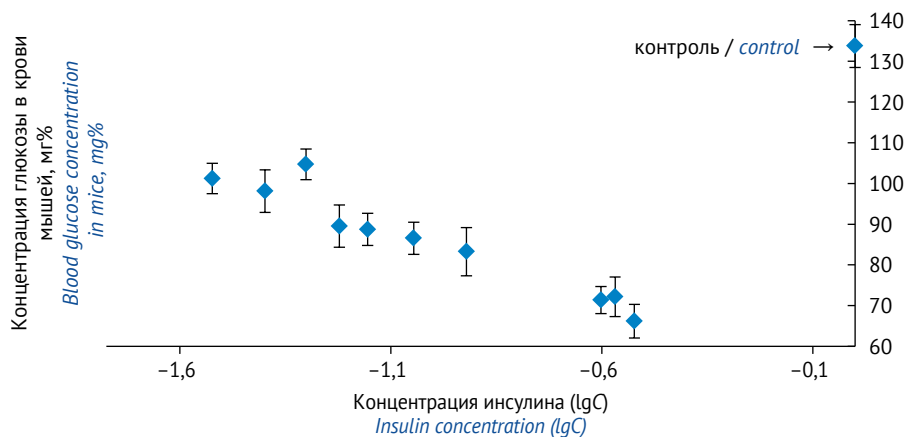


Рис. 1. Реакция мышей-самок на введение инсулина различных концентраций

Fig. 1. Responses of female mice to various concentrations of insulin

Таблица 2. Объединенная реакция мышей-самок на введение инсулина различных концентраций

Table 2. Pooled responses of female mice to administration of different concentrations of insulin

Концентрация инсулина, МЕ/мл Insulin concentration, IU/mL	Число животных в группе (n) Number of animals in the group (n)	Средняя концентрация глюкозы в крови животных и полуширина доверительного интервала ($\bar{c} \pm \Delta\bar{c}$), мг% (P = 99%) Average blood glucose concentration in the animals and confidence interval half-width ($\bar{c} \pm \Delta\bar{c}$), mg% (P = 99%)
0,040	403	101,78 \pm 2,38
0,085	408	87,13 \pm 2,31
0,273	268	70,14 \pm 2,33

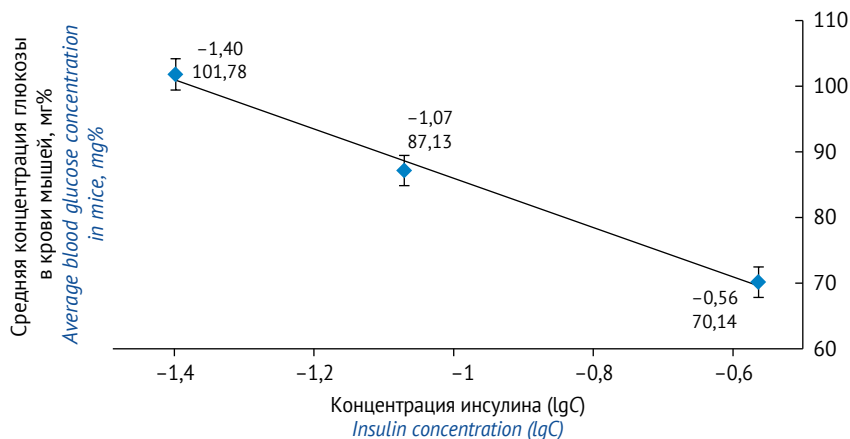


Рис. 2. Объединенная реакция мышей-самок на введение инсулина различных концентраций с линейной аппроксимацией

Fig. 2. Pooled responses of female mice to administration of different concentrations of insulin, with linear approximation

во всем исследованном диапазоне вводимых концентраций, о чем свидетельствует значимая регрессия ($304,06 > 6,66$) и незначимая нелинейность ($2,41 < 3,85$). Приведенные доказательства позволяют рекомендовать любой достаточно широкий участок вышеуказанного диапазона аналитической области для подбора конкретных концентраций инсулина при проведении биологических испытаний. При этом следует

учитывать, что в осенне-зимний период наблюдается тенденция к снижению чувствительности мышей к инсулину, а в весенне-летний – к ее повышению. Приведем несколько примеров выбора концентраций инсулина при проведении испытания двойным перекрестом.

Пример № 1 иллюстрирует применение инсулина в концентрациях, оптимальных для осенне-зимнего периода. В этом испытании малые

Таблица 3. Дисперсионный анализ объединенной реакции мышей-самок на введение инсулина

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) of the pooled responses of female mice to insulin

Определяемый показатель <i>Test parameter</i>	Число степеней свободы (f) <i>Number of degrees of freedom (f)</i>	Сумма квадратов <i>Sum of squares</i>	Средний квадрат <i>Mean square</i>	Значение критерия Фишера <i>Fisher test value</i>		Доверительная вероятность (P) <i>Confidence probability (P)</i>
				$F_{наб.}$ F_{obs}	$F_{критич.}$ F_{crit}	
Регрессия <i>Regression</i>	1	160892,75	160892,75	304,06 > 6,66		0,99
Отклонение от регрессии (нелинейность) <i>Departure from regression (nonlinearity)</i>	1	1274,36	1274,36	2,41 < 3,85		0,95
Постановки (межгрупповая дисперсия) <i>Treatments (intergroup variance)</i>	2	162167,11	81083,55	153,24 > 3,00		0,95
Отклонение (внутригрупповая дисперсия) <i>Error (intragroup variance)</i>	1076	569357,32	529,14			
Итого (Σ_{yy}) <i>Total (Σ_{yy})</i>	1078	731524,43	678,59			

ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ						
	f	СУММА		$F_{набл.}$	$F_{критич.}$	
		КВАДРАТОВ	КВАДРАТ			
ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ	1	529,3058	529,3058	0,9227312	<	4,0637022 (P=95%)
ДНИ*ПРЕПАРАТЫ	1	2083,5251	2083,5251	3,6321795	<	4,0637022 (P=95%)
ДНИ*РЕГРЕССИЮ	1	636,39487	636,39487	1,109418	<	4,0637022 (P=95%)
ОТКЛОНЕНИЕ (1)	43	24666,067	573,62946			
БЛОКИ	47	27915,292	593,94239			
ПРЕПАРАТЫ	1	61,510711	61,510711	0,1459036	<	4,0637022 (P=95%)
РЕГРЕССИЯ	1	10801,621	10801,621	25,621486	>	7,2473073 (P=99%)
ДНИ	1	88,324252	88,324252	0,2095055	<	4,0637022 (P=95%)
ДНИ*ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ	1	426,87925	426,87925	1,0125592	<	4,0637022 (P=95%)
ОТКЛОНЕНИЕ (2)	43	18128,133	421,58449			
ИТОГ	94	57421,761				

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ЕЁ ДОВЕРИТЕЛЬНЫЕ ГРАНИЦЫ

$I = 0,552842$
 $t = 2,0165411$ (P=95%)
 $b = -38,37407$
 $y^{\wedge}z = 72,052875$
 $y^{\wedge}u = 73,653795$
 $M'u = -0,041719$

ОЖИДАЕМАЯ АКТИВНОСТЬ = $100 \sqrt{\frac{Ru}{Mu}}$

$Mu = 1,9582812$ $90,84085$ МЕ/мл $90,84085$ %
 $C = 1,1886536$ Доверительные границы Ru
 ниж. = $1,7094766$ $51,224363$ МЕ/мл $51,224363$ %
 верх. = $2,191345$ $155,36207$ МЕ/мл $155,36207$ %
 $W = 70,05146$ Ширина дов. инт. = $1,0413771$
 $s/b = 0,5350624$

Рис. 3. Проверка правильности результатов биологического испытания и вычисление биологической активности инсулина (пример № 1)

Fig. 3. Validation of biological test results and calculation of the biological activity of insulin (example 1)

и большие концентрации СО инсулина равны 0,07 и 0,25 МЕ/мл. Для проверки правильности полученных результатов испытания провели дисперсионный анализ данных (рис. 3).

Так как методика анализа двойного перекреста значительно сложнее, чем анализ одной линии (табл. 3), то для вычисления основных показателей, характеризующих правильность постановки испытания, необходим ряд дополнительных показателей. О наличии или отсутствии статистически значимой дозозависимости линии ответа и непараллельности линий первого и второго дня соответственно судят по показателям «Регрессия» и «Дни × параллельность»⁷. Если хотя бы один из этих двух показателей не соответствует нижеописанным требованиям ОФС, результаты испытания следует признать недостоверными.

На рисунке 3 показатели, характеризующие правильность постановки, выделены рамкой. Для «Регрессии», отражающей дозозависимость, наблюдаемое значение критерия Фишера ($F_{набл.}$) должно быть больше его критического значения ($F_{критич.}$) при данном

числе степеней свободы (f_1 для «Регрессии» и f_2 для «Отклонения (2)»). Критические значения критерия Фишера определяют по справочной таблице. В примере № 1 для показателя «Регрессия» $F_{набл.}$ составляет 25,62. По справочной таблице необходимо найти $F_{критич.}$ для значений $f_1 = 1$ и $f_2 = 43$ при доверительной вероятности $P = 99\%$, которое составляет 7,25 (рис. 3). Таким образом, полученное неравенство свидетельствует о наличии статистически значимой дозозависимости результатов биологического испытания.

$F_{набл.}$ для показателя «Дни × параллельность», характеризующего непараллельность линий графика в разные дни, должно быть меньше критического значения ($F_{критич.}$) для данного числа степеней свободы (f_1 для «Дни × параллельность» и f_2 для «Отклонения (2)»). Для показателя «Дни × параллельность» $F_{набл.}$ составляет 1,01, что меньше значения $F_{критич.}$ для $f_1 = 1$ и $f_2 = 43$

ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ					
	f	СУММА		СРЕДНИЙ	
		КВАДРАТОВ	КВАДРАТ	$F_{набл.}$	$F_{критич.}$
ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ	1	1765,4296	1765,4296	2,5575283	< 4,0583956 (P=95%)
ДНИ*ПРЕПАРАТЫ	1	67,269691	67,269691	0,0974517	< 4,0583956 (P=95%)
ДНИ*РЕГРЕССИЮ	1	29,480558	29,480558	0,0427077	< 4,0583956 (P=95%)
ОТКЛОНЕНИЕ (1)	44	30372,647	690,28743		
БЛОКИ	47	32234,827	685,84738		
ПРЕПАРАТЫ	1	2912,6855	2912,6855	9,6384218	> 4,0583956 (P=95%)
РЕГРЕССИЯ	1	30425,22	30425,22	100,68066	> 7,2336229 (P=99%)
ДНИ	1	439,04688	439,04688	1,4528582	< 4,0583956 (P=95%)
ДНИ*ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ	1	3403,2469	3403,2469	11,261748	> 4,0583956 (P=95%)
ОТКЛОНЕНИЕ (2)	44	13296,592	302,19527		
ИТОГ	95	82711,618			

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ЕЁ ДОВЕРИТЕЛЬНЫЕ ГРАНИЦЫ		
I	=	0,69897
t	=	2,0151997 (P=95%)
b	=	-50,93927
y^z	=	82,590667
y^u	=	93,607104
M^u	=	-0,216266
ОЖИДАЕМАЯ АКТИВНОСТЬ =		100 МЕ/мл
		R_u
M_u	=	1,7837339 60,776249 МЕ/мл 60,776249 %
C	=	1,0420311 Доверительные границы R_u
ниж.	=	1,6243671 42,108241 МЕ/мл 42,108241 %
верх.	=	1,9249209 84,124185 МЕ/мл 84,124185 %
W	=	179,82573 Ширина дов.инт.= 0,4201594
s/b	=	0,3412645

Рис. 4. Проверка правильности результатов биологического испытания и вычисление биологической активности инсулина (пример № 2)

Fig. 4. Validation of biological test results and calculation of the biological activity of insulin (example 2)

⁷ ОФС.1.1.0014.15. Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

ДЕНЬ I	S1 = 953,593	U1 = 1117,967		
	S2 = 647,896	U2 = 798,65022	СУММА	
	S = 1601,489	U = 1916,6172	3518,1062	
ДЕНЬ II	S1 = 1009,15	U1 = 914,198		
	S2 = 1070,957	U2 = 828,7056	СУММА	
	S = 2080,107	U = 1742,9036	3823,0106	
СУММА	3681,596	3659,5208	7341,1168	
	ЛИНЕЙНЫЕ КОНТРАСТЫ		СУММА	
	LS1 = -305,697	LU1 = -319,3168	-625,0138	
	LS2 = 61,807	LU2 = -85,4924	-23,6854	
	LS = -243,89	LU = -404,8092	-648,6992	
N = 96			Концентрации	
n = 24	m = 3		0,1 МЕ/мл	
K = 561374,96			0,29 МЕ/мл	
Итого = 62675,755				
ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ				
	СУММА	СРЕДНИЙ		
	f	КВАДРАТОВ	КВАДРАТ	F _{набл.}
ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ	1	269,73939	269,73939	0,3561458
ДНИ*ПРЕПАРАТЫ	1	4432,6723	4432,6723	5,8526026
ДНИ*РЕГРЕССИЮ	1	3766,6231	3766,6231	4,973196
ОТКЛОНЕНИЕ (1)	41	31052,777	757,38481	
БЛОКИ	47	39521,812	840,88962	
ПРЕПАРАТЫ	1	5,076182	5,076182	0,0118179
РЕГРЕССИЯ	1	4383,444	4383,444	10,205128
ДНИ	1	968,40291	968,40291	2,254546
ДНИ*ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ	1	186,14835	186,14835	0,4333733
ОТКЛОНЕНИЕ (2)	41	17610,872	429,53345	
ИТОГ	92	62675,755		
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ЕЁ ДОВЕРИТЕЛЬНЫЕ ГРАНИЦЫ				
I = 0,462398				
t = 2,0194251 (P=95%)				
b = -29,22713				
y^s = 76,699917				
y^u = 76,240017				
M'u = 0,0157354				
ОЖИДАЕМАЯ АКТИВНОСТЬ =	100 МЕ/мл			
	Ru			
Mu = 2,0157354	103,68964 МЕ/мл	103,68964	%	
S = 1,6655857	Доверительные границы Ru			
ниж. = 1,6486048	44,525087 МЕ/мл	44,525087	%	
верх. = 2,4038124	253,40339 МЕ/мл	253,40339	%	
W = 28,601099	Ширина дов.инт. =	2,088783		
s/b = 0,7091079				

Рис. 5. Проверка правильности результатов биологического испытания и вычисление биологической активности инсулина (пример № 3)

Fig. 5. Validation of biological test results and calculation of the biological activity of insulin (example 3)

при $P = 95\%$, равного 4,06. Это свидетельствует об отсутствии статистически значимой непараллельности результатов в разные дни. Следовательно, они параллельны.

Таким образом, результаты биологического испытания следует признать достоверными. Найденная биологическая активность испытуемого образца составила 91 (51–155) МЕ/мл ($P = 95\%$).

В качестве примера № 2 (рис. 4) можно рассмотреть пробное испытание, которое проводили в межсезонье, ближе к весне, поэтому изменили меньшую концентрацию инсулина, снизив ее до 0,05 МЕ/мл, а большую оставили равной 0,25 МЕ/мл.

Согласно данным, представленным на рисунке 4, для показателя «Регрессия», $F_{\text{набл.}}$ составляет 100,68, что больше $F_{\text{критич.}} = 7,23$ для $f_1 = 1$ (для «Регрессии») и $f_2 = 44$ (для «Отклонения (2)») при $P = 99\%$, что свидетельствует о статистически значимой дозозависимости результатов биологического испытания.

Для показателя «Дни × параллельность» $F_{\text{набл.}} = 11,26$, что больше $F_{\text{критич.}} = 4,06$ для $f_1 = 1$ и $f_2 = 44$ при $P = 95\%$. Это свидетельствует о наличии статистически значимой непараллельности результатов в разные дни. Таким образом, результаты биологического испытания (пример № 2) следует признать недостоверными из-за статистически значимой непараллельности результатов в разные дни. Это может быть связано со слабой и непостоянной реакцией животных на введение малой концентрации инсулина в разные дни. При перестановке испытания следует рассмотреть вопрос об увеличении малой концентрации раствора инсулина.

Пример № 3 (рис. 5) иллюстрирует ситуацию, когда чувствительность животных оказалась выше ожидаемой. Испытание проведено в начале зимнего периода, поэтому, предполагая, что чувствительность мышей к инсулину ниже в этот период, использовали более высокие концентрации инсулина (0,1 и 0,29 МЕ/мл). На рисунке 5 представлены суммарные ответы мышей на введение стандартного и испытуемого образца в малых и больших концентрациях, а также результаты дисперсионного анализа.

В первый день испытания наблюдалась выраженная дозозависимая реакция животных на введение инсулина в малых и больших концентрациях (стандартный и испытуемый образец) (рис. 5). Однако во второй день испытания дозозависимость практически отсутствовала в группе мышей, получивших инсулин в виде СО

в малых и больших концентрациях, и наблюдалась слабая дозозависимость в группах мышей, получивших испытуемый препарат.

Несмотря на отсутствие непараллельности ($F_{\text{набл.}} = 0,43 < F_{\text{критич.}} = 4,08$), использование вышеуказанных концентраций привело к довольно слабой дозозависимости (близкие значения $F_{\text{набл.}} = 10,21 > F_{\text{критич.}} = 7,28$), что отразилось на низкой точности результатов (ширина доверительного интервала $2,0887 \times 100 = 209\%$). Очевидно, что в данном случае необходима перестановка испытания. При этом следует уменьшить обе концентрации инсулина, что позволит нормализовать дозозависимость и доверительный интервал.

Заключение

На основании данных, полученных при определении биологической активности инсулина, показана линейность и дозозависимость реакции мышей-самок на введение инсулина в концентрациях 0,03–0,3 МЕ/мл, что позволяет рекомендовать использование данного диапазона в качестве ориентировочного для определения биологической активности инсулина на мышах-самках.

Продемонстрированы подходы к выбору концентраций инсулина на конкретных примерах определения биологической активности с учетом сезонного изменения чувствительности мышей-самок. Проведенный статистический анализ данных показал снижение чувствительности животных в осенне-зимний период и повышение в весенне-летний, что требует соответствующей корректировки концентраций инсулина.

Методика на мышах имеет ряд преимуществ: на кроликах испытание продолжается не менее двух недель, а на мышах два дня. Это делает ее экономически более выгодной, так как требует меньше трудовых и временных затрат, а также ресурсов для содержания животных.

Результаты данной работы могут представлять интерес для сотрудников контрольных служб, фирм-производителей, а также при проведении доклинических исследований новых препаратов инсулина.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Аметов АС, Пуговкина ЯВ, Вовк ПС. Инсулинотерапия – история успеха длиной в век. Фокус на базальный инсулин. *Эндокринология: новости, мнения, обучение*. 2021;10(1):27–33. [Ametov AS, Pugovkina YaV, Vovk PS. Insulin therapy is a century-long success story. Focus on basal insulin. *Endocrinologiya: novosti, mneniya, obuchenie = Endocrinology: News, Opinions, Training*. 2021;10(1):26–33 (In Russ.)] <https://doi.org/10.33029/2304-9529-2021-10-1-26-33>
2. Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК, Мотузова ЕВ, Лысикова СЛ, Солдатов АА, Авдеева ЖИ. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лече-*

- ние. 2017;17(1):13–26. [Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, Motuzova EV, Lysikova SL, Soldatov AA, Avdeeva ZhI. Assessment of biotechnological products specific activity. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(1):13–26 (In Russ.)]
3. Бездетко НВ. Биосимиляры аналогов инсулина: что необходимо знать клиницисту. *Український медичний часопис*. 2016(1):35–41. [Bezdetko NV. Insulin analog biosimilars: what a clinician needs to know. *Ukrains'kiy medichny chasopis = Ukrainian Medical Journal*. 2016(1):35–41 (In Russ.)]
 4. Батуашвили ТА, Симутенко ЛВ, Шадрин ПВ, Неугодова Н.П. Современные подходы к определению биологической активности инсулина и его аналогов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(2):85–92. [Batuashvili TA, Simutenko LV, Shadrin PV, Neugodova NP. Modern approaches to determination of the biological activity of insulin and its analogues. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(2):85–92 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-2-85-92>
 5. Яковлева ТВ, Казанцева АЮ, Макарова ЕН, Бажан НМ. Половые различия молекулярных механизмов чувствительности к инсулину у молодых и взрослых мышей C57BL/6J. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(7):833–40. [Yakovleva TV, Kazantseva AYU, Makarova EN, Bazhan NM. Sex differences of molecular mechanisms of insulin sensitivity in young and adult C57BL/6J mice. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(7):833–40 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18699/VJ17.303>
 6. Burn JH, Finney DJ, Goodwin LG. *Biological Standardization*. 2nd ed. London: Oxford University Press; 1952.

Вклад авторов. П.В. Шадрин – обоснование концепции исследования, проведение вычислений, выполнение сравнительного анализа полученных результатов, анализ и обобщение данных литературы, работа с графическим материалом, написание и оформление текста рукописи; Л.В. Симутенко – планирование исследования, обсуждение полученных результатов и формулировок; Т.А. Батуашвили – обобщение результатов исследования, редактирование и критический пересмотр текста рукописи; Н.П. Неугодова – идея, консультация, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; Е.О. Чететова – проведение биологических испытаний.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. Pavel V. Shadrin – substantiation of the research concept, carrying out calculations and comparative analysis, analysis and consolidation of literature data, work with graphic material, writing and formatting of the manuscript; Lyudmila V. Simutenko – planning of the study, discussion of the obtained results; Tamara A. Batuashvili – consolidation of the study results, editing and critical revision of the text of the manuscript; Natalia P. Neugodova – elaboration of the study idea, advisory assistance, approval of the final version of the manuscript for publication; Ekaterina O. Chechetova – execution of biological testing.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Шадрин Павел Валерьевич.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7143-8227>
shadrin@expmed.ru

Симутенко Людмила Васильевна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2373-8756>
simutenko@expmed.ru

Батуашвили Тамара Ариеловна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2656-8131>
batuashvili@expmed.ru

Неугодова Наталья Петровна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>
neugodova@expmed.ru

Чететова Екатерина Олеговна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6728-594X>
stepanuk@expmed.ru

Статья поступила 23.11.2021

После доработки 23.06.2022

Принята к печати 31.08.2022

Online first 28.10.2022

Pavel V. Shadrin.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7143-8227>
shadrin@expmed.ru

Lyudmila V. Simutenko, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2373-8756>
simutenko@expmed.ru

Tamara A. Batuashvili, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2656-8131>
batuashvili@expmed.ru

Natalia P. Neugodova, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>
neugodova@expmed.ru

Ekaterina O. Chechetova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6728-594X>
stepanuk@expmed.ru

Article was received 23 November 2021

Revised 23 June 2022

Accepted for publication 31 August 2022

Online first 28 October 2022