

УДК: 615.033.1

Динамика уровня паратиреоидного гормона для сравнительной оценки всасывания препаратов кальция из желудочно-кишечного тракта

Ерёменко Н.Н., Ших Е.В., Сереброва С.Ю.

ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Цель исследования состояла в комплексной оценке сопоставимости биодоступности кальция при приеме исследуемого и референтного препаратов. **Методы.** У 42 молодых добровольцев-мужчин сравнивали фармакокинетические параметры следующих препаратов: референтного, который в своем составе содержит 1000 мг кальция и 800 МЕ колекальциферола (2 таблетки) и исследуемого препарата, содержащего 1200 мг кальция и 1000 МЕ колекальциферола (1 таблетка). **Результаты.** Средние значения основных фармакокинетических параметров кальция, определявшиеся в течение 8 часов — максимальная концентрация (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (T_{max}) и площадь под фармакокинетической кривой «концентрация — время» общего кальция сыворотки (AUC_{0-8}) у лиц, принимавших исследуемый и референтный препараты, были сходными. Представлены результаты измерения уровня паратиреоидного гормона у добровольцев при приеме препаратов кальция; проведена оценка экскреции кальция с мочой с пересчетом на экскрецию креатинина. **Заключение.** Для оценки всасывания кальция из различных лекарственных средств, предлагается наряду с использованием стандартного способа расчета площади под кривой «концентрация — время» общего кальция сыворотки, оценивать экскрецию кальция с мочой с пересчетом на экскрецию креатинина и уровень паратиреоидного гормона.

Ключевые слова: фармакокинетика, паратгормон, кальций, креатинин, всасывание, экскреция.

Для корреспонденции: Ерёменко Наталья Николаевна, канд. мед. наук, доцент кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва. e-mail: eremenkonn2014@gmail.com.

Для цитирования: Ерёменко Н.Н., Ших Е.В., Сереброва С.Ю. Динамика уровня паратиреоидного гормона для сравнительной оценки всасывания препаратов кальция из желудочно-кишечного тракта. Патогенез. 2016; 14(4): 69–73.

Поступила 30.07.2016

The dynamics of the parathyroid hormone level for the comparative evaluation of calcium absorption from the gastrointestinal tract

Eremenko N.N., Shikh E.V., Serebrova S.Y.

State Federal-Funded Educational Institution of Higher Professional Training I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation 119991, Moscow, Trubetskaya str., 8, p.2

This article discusses the features of pharmacokinetic parameters evaluation in studies of bioequivalence (BE) on the example of the following drugs: the reference, which in its structure contains 1,000 mg of calcium and 800 IU cholecalciferol (2 tablets) and the test formulation containing 1200 mg of calcium and 1,000 IU cholecalciferol (1 tablet). The results of measurements of parathyroid hormone levels in volunteers at the reception of preparations of calcium; evaluated the excretion of calcium in the urine with the terms of creatinine excretion. For conducting expert evaluation of calcium absorption from various medicines offered along with standard way of calculating the area under the curve «concentration — time» total calcium in serum, to assess the excretion of calcium in the urine with the terms of the excretion creatinine and the change in the level of parathyroid hormone.

Key words: comparative pharmacokinetic, parathormone, calcium; endogenous compound, expert evaluation.

For correspondence: Nataliya Eremenko, State Federal-Funded Educational Institution of Higher Professional Training I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. Moscow. e-mail: eremenkonn2014@gmail.com.

For citation: Eremenko N.N., Shikh E.V., Serebrova S.Y. The dynamics of the parathyroid hormone level for the comparative evaluation of calcium absorption from the gastrointestinal tract. Patogenez. 2016; 14(4): 69–73.

Received 30.07.2016

Введение

Эндогенные соединения — это соединения, которые вырабатываются клетками организма человека вследствие протекающих в нем физиологических и (или) патологических процессов и, как правило, являются биологически активными веществами, принимающими участие в различных метаболических процессах организма [1]. На сегодняшний день насчитывается большое количество лекарственных препаратов, являющихся аналогами эндогенных соединений (АЭС), в основном, это гормоны, ферменты, белки, ионы, витамины, ферменты.

Для оценки эффективности и безопасности, новых АЭС (в твердых лекарственных формах: таблетки, капсулы) необходимо проведение сравнительных фармакокинетических исследований биоэквивалентности (БЭ) *in vivo*. Эндогенные вещества присутствуют в организме в определенных базовых (фоновых) концентрациях. Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация — время» эндогенного вещества (AUC, Area Under the Curve) складывается из суммы его базовой концентрации (baseline) и экзогенной концентрации. AUC — фармакокинетический параметр, характеризующий суммарную концентрацию лекарственного препарата в плазме крови в течение всего времени наблюдения (рис. 1).

В некоторых случаях базовые эндогенные концентрации (БЭК) могут быть более или менее постоянными; в других случаях — значительно варьируемыми (например, из-за различных эндогенных процессов, циркадных ритмов и др.); в других ситуациях БЭК могут оставаться без изменений в крови, но концентрация соединения увеличивается в другом компартменте организма, например в моче [2–4].

Таким образом, фоновое содержание эндогенных веществ в организме, особенно подверженных колебаниям, вносит дополнительное искажение при определении концентрации АЭС, что затрудняет оценку биодоступности и БЭ таких препаратов, так как не всегда возможно вычленить влияние данного искажения на полученные результаты. На рис. 2 представлены характеристики различных видов динамики БЭК: вид «стабильная базовая линия», кото-

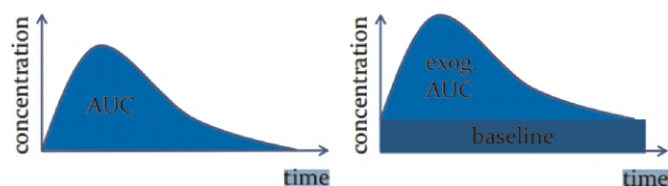


Рис. 1. Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация — время» эндогенного вещества (AUC) складывается из суммы его базовой концентрации (baseline) и экзогенной концентрации.

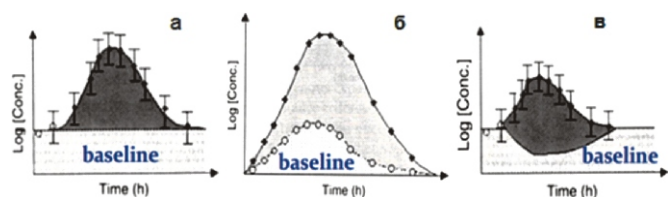


Рис. 2. Виды базовых линий концентраций эндогенных веществ [2–4]. Нижние кривые — исходная концентрация, верхние кривые — динамика концентрации при введении экзогенного вещества. Пояснения в тексте.

рая характерна, например, для половых гормонов: эстрадиола, прогестерона (рис. 2а); вид «предсказуемо нестабильная базовая линия», характерный для циркадного ритма, суточного колебания эндогенных веществ, например, высокие концентрации тестостерона или кортизола утром и низкие вечером (рис. 2б); вид «непредсказуемо нестабильная базовая линия», которая может наблюдаться в двух случаях:

а) реагирование по типу «обратной связи», когда организм пытается контролировать концентрации эндогенных веществ и уменьшает синтез эндогенного вещества в ответ на введение экзогенного;

б) стабилизация концентраций вследствие включения регуляции гомеостаза (рис. 2в).

Существующие гомеостатические механизмы поддержания уровня некоторых эндогенных веществ в пределах физиологической нормы не допускают изменения концентрации до токсичного уровня. Это утверждение относится к ряду ионов: калия, кальция, магния, железа и алюминия; глютамину; L-карнитину и некоторым витаминам (D₂, D₃ и B₁₂) [5]. В некоторых случаях применение даже большого количества ЛП-аЭС, не изменяет гомеостатического равновесия эндогенного вещества и приводит к незначительному повышению его концентрации в крови, тем самым усложняя оценку биоэквивалентности подобных ЛП-аЭС [5].

Цель исследования состояла в комплексной оценке сопоставимости биодоступности кальция при приеме исследуемого и референтного препаратов.

Материалы и методы

В данной статье рассматриваются особенности анализа фармакокинетических параметров в рамках исследований БЭ на примере следующих препаратов: референтного, который в своем составе содержит 1000 мг кальция и 800 МЕ колекальциферола (2 таблетки) и исследуемого препарата, содержащего 1200 мг кальция и 1000 МЕ колекальциферола (1 таблетка). Для данного исследования использовались подходы, регламентируемые соответствующими нормативными руководствами Российской Федерации (РФ), Соединенных Штатов Америки (США) и Европейского союза (ЕС) [6–9].

Учитывая, высокий эндогенный уровень кальция и волнообразное колебание его после приема, в данном исследовании был предусмотрен расчет фармакокинетических параметров с учетом (вычетом) эндогенного уровня, что совпадает с требованием, предъявляемым ЕМА (European Medicines Agency) к подобным исследованиям [9].

Изучение фармакокинетических параметров исследуемых препаратов кальция строилось на трех основных величинах:

1. Изучение площади под фармакокинетической кривой «концентрация действующего вещества — время» в интервале времени от «0» до момента отбора последней пробы биоматериала — 8 часов (AUC₀₋₈) общего кальция сыворотки с учетом исключения естественного (эндогенного) уровня кальция. Для учета эндогенного уровня от значений концентрации на момент оценки вычиталось значение концентрации кальция на первую точку определения (время «0») [9];

2. Изучение выведения кальция — экскреции кальция с мочой с пересчетом на экскрецию креатинина. Такой пересчет был сделан, так как при исследовании фармако-

кинетики эндогенных соединений необходимо принимать во внимание гомеостатические механизмы, регулирующие концентрацию эндогенных соединений (соотношение кальция и креатинина в моче должно сохраняться в пределах физиологической нормы), включая механизмы выведения соединений [5];

3. В качестве одного из критериев определения было выбрано изменение уровня паратиреоидного гормона ПТГ (интактный паратгормон), так как ПТГ — один из главных гормонов, регулирующих фосфатно-кальциевый гомеостаз. Основная функция ПТГ — регуляция концентрации ионизированного кальция (Ca^{2+}) в сыворотке крови. Механизм действия ПТГ складывается из нескольких моментов: усиление реабсорбции кальция в почках и, как следствие, ограничение его выведения с мочой; повышение активности ренальной α -гидроксилазы и стимуляция синтеза 1,25-дигидроксивитамина D3 (таким образом ПТГ опосредовано оптимизирует всасывание кальция в тонком кишечнике); увеличение потери фосфата с мочой и снижение уровня фосфата крови [10, 11]. Кроме того, уменьшение уровня ПТГ после приема препарата, содержащего кальций, является проявлением биологически значимого эффекта и широко используется за рубежом в качестве критерия эффективности всасывания при регистрации лекарственных средств, содержащих кальций [12, 13], что продемонстрировано на рис. 3.

Таким образом, при комплексной оценке всех трех параметров (1 — площади под фармакокинетической кривой «концентрация — время» общего кальция сыворотки, 2 — экскреции кальция с мочой с пересчетом на экскрецию креатинина; 3 — по изменению уровня ПТГ) можно оценить относительную биодоступность лекарственных препаратов, содержащих кальций и сделать вывод о поступлении в организм кальция в количестве, которое оказывает терапевтический эффект, но не изменяет физиологической нормы и не допускает изменения концентрации до токсичного уровня.

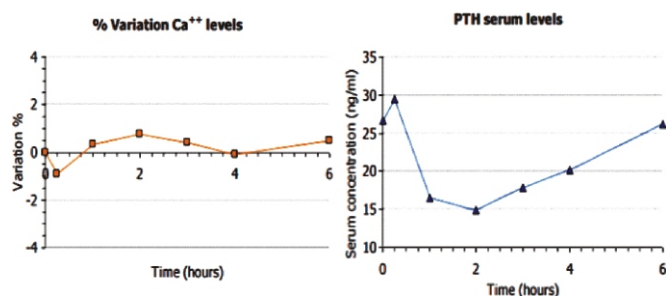


Рис. 3. Фармакодинамика и фармакокинетика: всасывание кальция и паратгормона (PTH) [12, 13]. Слева по оси ординат — колебание концентрации Ca^{2+} в процентах от исходного уровня. Справа по оси ординат — динамика уровня паратгормона при введении Ca^{2+} .

В исследовании приняли участие 42 здоровых мужчин-добровольцев, возраст которых составлял $27,6 \pm 5,2$, вес $70,3 \pm 5,3$ кг. Добровольцы были разделены на 2 группы в соотношении 1:1. 21 доброволец принимал однократно сначала исследуемый препарат, а затем, спустя 7 дней, — референтный препарат, в другой группе препараты принимались в обратном порядке.

Так как кальций поступает в организм с пищей, то, согласно требованиям FDA (Food and Drug Administration), при исследовании фармакокинетики и БЭ необходим строгий контроль содержания соединения в пище до начала исследования и на всем его протяжении [8]. За 2 дня до приема препаратов добровольцы соблюдали диету со сниженным содержанием кальция (исключался творог, сыр, орехи, сметана, сливки, фасоль, каши на молоке).

Забор проб крови осуществлялся в количестве 10 мл в стеклянные гепаринизированные пробирки до (8 часов утра) и через 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ч после приема препарата. Прием препарата проводился вместе с легким завтраком. Далее прием пищи проводился в 14 часов и включал продукты со сниженным содержанием кальция. Перед прие-

Таблица 1

Средние значения концентраций общего кальция сыворотки (ммоль/л) у добровольцев при приеме референтного и исследуемого препаратов с учетом исходного эндогенного уровня

Время	0,5 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч
Референтный препарат							
M ± m	0,14 ± 0,08	0,21 ± 0,1	0,31 ± 0,1	0,32 ± 0,1	0,28 ± 0,12	0,2 ± 0,08	0,08 ± 0,05
Med	0,115	0,17	0,26	0,28	0,29	0,21	0,08
Min/Max	0/0,51	0,05/0,65	0,07/0,8	0/0,79	0/0,7	0/0,54	0/0,8
Исследуемый препарат							
M ± m	0,112 ± 0,07	0,24 ± 0,1	0,39 ± 0,15	0,31 ± 0,13	0,22 ± 0,11	0,17 ± 0,1	0,12 ± 0,07
Med	0,1	0,21	0,4	0,31	0,17	0,14	0,09
Min/Max	0/0,3	0,02/0,71	0/1,09	0/1,54	0/0,8	0/0,73	0/0,99

Таблица 2

Основные фармакокинетические параметры при приеме добровольцами референтного и исследуемого препаратов с учетом эндогенного уровня кальция

	C_{max} (ммоль/л)		T_{max} (ч)		AUC_{0-8} (ммоль/л*ч)	
	Референтный	Исследуемый	Референтный	Исследуемый	Референтный	Исследуемый
M ± m	0,39 ± 0,13	0,48 ± 0,12	2,9 ± 0,95	2,06 ± 0,5	20,2 ± 0,9	18,9 ± 1,4
Med	0,37	0,44	2	2	20,24	18,74
Min/Max	0,79/0,12	0,03/1,54	2/8	0/6	18,2/21,5	15,6/22,5

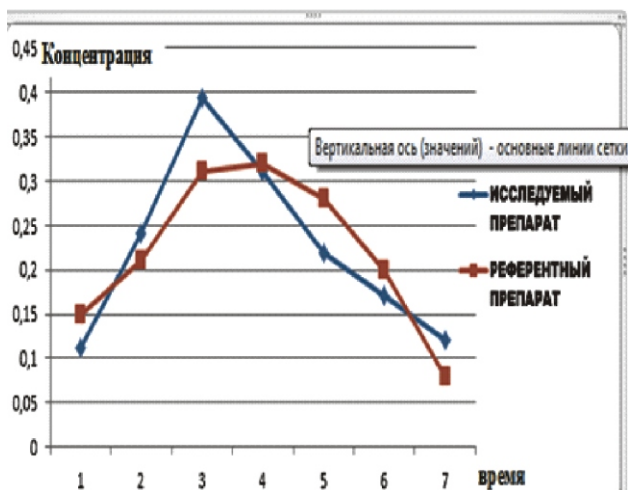


Рис. 4. Фармакокинетическая кривая зависимости «концентрация — время» общего кальция сыворотки при приеме исследуемых препаратов с учетом исходного эндогенного уровня кальция. По оси ординат — концентрация кальция (моль/л), по оси абсцисс — время (ч).

мом препарата добровольцы опорожняли мочевого пузыря и на протяжении 8 часов после приема препарата проводился сбор мочи. Кровь для анализа содержания интактного паратгормона (iPTH) в количестве 3 мл отбирали до приема препарата и через 2 ч после приема препарата.

Результаты и обсуждение

Для учета эндогенного уровня кальция, был проведен пересчет концентраций: от величины концентрации в определенной точке фармакокинетической кривой вычитали значение уровня концентрации кальция в исходной точке (первой точке определения, время «0»). Концентрация общего кальция в сыворотке у добровольцев при приеме пре-

паратов (референтного и исследуемого) с учетом исходного эндогенного уровня представлены в табл. 1.

Основные фармакокинетические параметры: максимальная концентрация (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (T_{max}) и площадь под фармакокинетической кривой «концентрация — время» общего кальция сыворотки (AUC_{0-8}) приведены в табл. 2.

На основании рассчитанных значений концентрации общего кальция сыворотки крови, была построена фармакокинетическая кривая зависимости «концентрация — время» общего кальция сыворотки при приеме препаратов (рис. 4).

Таким образом, средние величины основных фармакокинетических параметров (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-8}) кальция в группе добровольцев, принимавших исследуемый препарат и добровольцев, принимавших референтный препарат, были сходными.

Полученный результат свидетельствует о том, что при приеме изучаемого препарата абсорбируется не меньшее количество кальция, чем при приеме референтного препарата.

Оценка экскреции кальция с мочой за 8-часовой интервал после приема препаратов показала, что соотношение кальция и креатинина в моче оставалось в пределах физиологической нормы как после приема исследуемого так и референтного препаратов (табл. 3).

Результаты определения изменения концентрации ПТГ через 2 часа после приема препаратов представлены в табл. 4. До приема исследуемого и референтного препаратов уровень ПТГ в крови у добровольцев практически не различался. Через 2 часа после приема изучаемых препаратов было обнаружено сопоставимое уменьшение уровня ПТГ: при приеме тестируемого препарата — в среднем по группе на 51,2%, а референтного препарата — на 52,3%.

Таблица 3

Экскреция кальция с мочой у добровольцев на фоне однократного приема референтного и исследуемого препаратов в течение 8 часов после приема

	Объем мочи (мл)	Количество принятого Ca^{2+} (мкг)	Экскреция кальция с мочой (ммоль/л)	Креатинин (мкмоль/л)	Экскреция креатинина с мочой	Кальций Креатининовый коэффициент
Референтный препарат						
M ± m	1447,6 ± 317	201,5 ± 34,3	241,5 ± 59,7	1468,8 ± 371,5	1615 ± 218,3	0,14 ± 0,06
Med	1550	175,7	235,5	1462,8	1771,3	0,13
Min/Max	100/2500	32,8/460	45/836,6	251,1/2888,6	216/4102,05	0,03/0,31
Исследуемый препарат						
M ± m	1285,4 ± 306,7	207,8 ± 33,6	214,1 ± 38,4	1352,5 ± 334,5	1448,3 ± 2301,85	0,159 ± 0,06
Med	1475	183,3	236,5	1225,8	1264,8	0,15
Min/Max	65/2050	46,4/498,8	28,6/418,3	336,7/3485	170/3057,4	0,06/0,31

Таблица 4

Концентрация паратгормона (iPTH) до и после приема референтного и исследуемого препаратов

	Референтный препарат		Исследуемый препарат	
	До приема	После приема	До приема	После приема
M ± m	4,06 ± 1,85	1,95 ± 0,4	3,99 ± 0,9	1,92 ± 0,4
Med	4,09	1,87	3,81	1,54
Min/Max	1,62/6,83	0,37/4,01	1,35/7,1	0,36/4,57

Заключение

Итак, на основании существующих рекомендаций по проведению исследований биоэквивалентности [6–9] и научных публикаций по ЛП-аЭС [5, 14] были изучены сравнительные фармакокинетические параметры лекарственных препаратов кальция. Для проведения экспертной оценки всасывания эндогенного вещества кальция из различных лекарственных препаратов и сравнения биодоступности, наряду с использованием стандартного способа расчета площади под фармакокинетической кривой «концентрация — время» общего кальция сыворотки, целесообразно оценивать экскрецию кальция с мочой с пересчетом на экскрецию креатинина и изменение уровня паратиреоидного гормона.

Такие расчеты дают возможность учитывать гомеостатические механизмы, регулирующие концентрацию эндогенных соединений, включая механизмы выведения соединений. Уменьшение концентрации ПТГ после приема препарата, содержащего кальций, является проявлением биологически значимого эффекта. Совокупный учет этих параметров дает возможность провести объективную экспертную оценку относительной биодоступности лекарственных средств, содержащих эндогенное вещество — кальций.

Список литературы

1. Адонин В.К., Ромодановский Д.П., Ниязов Р.Р. Особенности проведения исследования биоэквивалентности лекарственных препаратов — аналогов эндогенных соединений. Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения . 2015; 3: 3-8.
2. Colucci, P et al. 2007: Bioequivalence Assessment of Endogenous Drug Substances: Pharmacokinetics and Statistical Evaluation. In: Generic Drug Product Development: Bioequivalence, First Edition, pp. 233-256.
3. Dissanayake S. Assessing the bioequivalence of analogues of endogenous substances ('endogenous drugs'): considerations to optimize study design. *Br J Clin Pharmacol.* 2010; 69(3): 238-44.
4. Gabrielsson, J and Weiner, D. Pharmacokinetic & Pharmacodynamic data analysis: Concepts and applications. Fourth edition. <http://bit.ly/cikale4>
5. Sanjeeva Dissanayake. Assessing the bioequivalence of analogues of endogenous substances («endogenous drugs»): considerations to optimize study design. *Br J Clin Pharmacol* 2010; (69): 238-44
6. Миронов АН, ред. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К; 2013.
7. Bioequivalence Studies with Pharmacokinetic Endpoints for Drugs Submitted Under an ANDA. United States Food and Drug Administration [internet]. [cited 2013 Sept 27]. from:<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM377465.pdf>.
8. Investigation of bioequivalence (CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1). European Medicines Agency [internet]. [cited 2013 Sept 27]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf.
9. Dawson-Hughes B., Dallal G.E., Krall E.A. et al. A controlled trial of the effect of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323(13): 878-83.

Сведения об авторах

Ерёменко Наталья Николаевна (Eremenko N.N.) — канд. мед. наук, доцент кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, e-mail: eremenkonn2014@gmail.com

Ших Евгения Валерьевна (Shikh E.V.) — докт. мед. наук, профессор, профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней.

Сереброва Светлана Юрьевна (Serebrova S.Y.) — докт. мед. наук, профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней

10. Shea B., Wells G., Cranney A. et al. Calcium supplementation on bone loss in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2004; 1: CD004526.

11. Antonio MARZO Master Universitario di II Livello Ricerca e Sviluppo Pre-Clinico e Clinico del Farmaco Modulo 4 — Sviluppo Clinico dei Farmaci Chieti, 14-15 novembre 2013

12. Marzo A. Open questions on bioequivalence: some problems and some solutions. *Pharmacol Res.* 1999; 40: 357-68.

13. Blakesley VA. Current methodology to assess bioequivalence of levothyroxine sodium products is inadequate. *AAPS J* 2005; (7): E42-6.

14. Gisclon LG, Bowen AJ, O'Reilly TE, Lakewold D, Curtin CR, Larson KL, Palmer SA, Natarajan J, Wong FA. Bioequivalence of a newly developed 17 beta-estradiol tablet vs. an identical reference formulation. *Arzneimittel Forschung.* 2000; (50): 910-4.

References

1. Adonin V.K., Romodanovskij D.P., Nijazov R.R. Features of the bioequivalence study of drugs — analogs of endogenous compounds. Sheets Scientific Centre of Expertise of Medical application. 2015; (3): 3-8. (in Russian).
2. Colucci, P et al. 2007: Bioequivalence Assessment of Endogenous Drug Substances: Pharmacokinetics and Statistical Evaluation. In: Generic Drug Product Development: Bioequivalence, First Edition, pp. 233-256.
3. Dissanayake S. Assessing the bioequivalence of analogues of endogenous substances ('endogenous drugs'): considerations to optimize study design. *Br J Clin Pharmacol.* 2010; 69(3): 238-44.
4. Gabrielsson, J and Weiner, D 2006: Pharmacokinetic & Pharmacodynamic data analysis: Concepts and applications. Fourth edition. // <http://bit.ly/cikale4>
5. Sanjeeva Dissanayake. Assessing the bioequivalence of analogues of endogenous substances («endogenous drugs»): considerations to optimize study design. *Br J Clin Pharmacol.* 2010; (69): 238-44
6. Mironov A.N, Ed. Guidance on the examination of drugs. T. I. М.: Гриф и К; 2013. (in Russian).
7. Bioequivalence Studies with Pharmacokinetic Endpoints for Drugs Submitted Under an ANDA. United States Food and Drug Administration [internet]. [cited 2013 Sept 27]. from:<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM377465.pdf>.
8. Investigation of bioequivalence (CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1). European Medicines Agency [internet]. [cited 2013 Sept 27]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf.
9. Dawson-Hughes B., Dallal G.E., Krall E.A. et al. A controlled trial of the effect of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323(13): 878-83.
10. Shea B., Wells G., Cranney A. et al. Calcium supplementation on bone loss in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2004; 1. CD004526.
11. Antonio MARZO Master Universitario di II Livello Ricerca e Sviluppo Pre-Clinico e Clinico del Farmaco Modulo 4 — Sviluppo Clinico dei Farmaci Chieti, 14-15 nov. 2013.
12. Marzo A. Open questions on bioequivalence: some problems and some solutions. *Pharmacol Res.* 1999; 40: 357-68.
13. Blakesley VA. Current methodology to assess bioequivalence of levothyroxine sodium products is inadequate. *AAPS J.* 2005; (7): E42-6.
14. Gisclon LG, Bowen AJ, O'Reilly TE, Lakewold D, Curtin CR, Larson KL, Palmer SA, Natarajan J, Wong FA. Bioequivalence of a newly developed 17 beta-estradiol tablet vs. an identical reference formulation. *Arzneimittelforschung.* 2000; (50): 910-14.