ISSN 2587–7836 (print)
ISSN 2686–8830 (online)

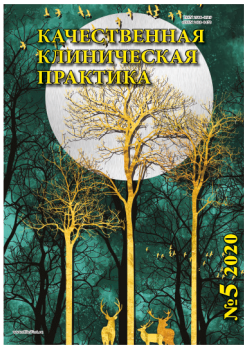
ФАРМАКОКИНЕТИКА и ДИНАМИКА

№ 3.2020

www.PharmacoKinetica.ru

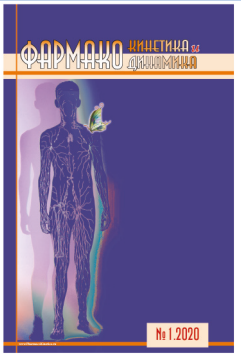
Издательство
ОКИ

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



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

Сайт журнала: www.clinvest.ru



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

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

Сайт журнала: www.pharmacogenetics-pharmacogenomics.ru

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

Сайт журнала: www.antibiotics-chemotherapy.ru

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

ФАРМАКОКИНЕТИКА И ФАРМАКОДИНАМИКА

№3
2020

Издательство ОКИ

Главный редактор
Жердев Владимир Павлович
д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, Москва

Зам. главного редактора
Смирнов Валерий Валерьевич
к.ф.н., Москва

Ответственный секретарь
Литвин Александр Алексеевич
д.б.н., Москва

Редакционная коллегия

Бондарева Ирина Борисовна
д.б.н., Москва

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

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

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

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

Колик Лариса Геннадьевна
д. б. н., профессор РАН, Москва

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

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

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

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

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

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

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

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

Тюренков Иван Николаевич
член-корр. РАН, д.м.н., профессор, Волгоград
д. б. н., профессор РАН, Москва

Шевченко Роман Владимирович
к.м.н., Москва

Выпускающая группа

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

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

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

Подписано в печать 23.12.2020 г. **Тираж** 400 экз.
Типография: ООО «Буки Веди», www.bukivedi.com
115093, г. Москва, Партийный переулок, д. 1, корп. 58, стр. 3, пом. 11

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

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

Сайты	Журналы
www. Antibiotics-Chemotherapy.ru	Антибиотики и Химиотерапия
www. ClinVest.ru	Качественная клиническая практика
www.Hospital-Apteka.ru	Дайджест «Больничная аптека»
www. PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru	Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

www. HealthEconomics.ru	Центр Фармакоэкономических Исследований
www. Market-Access-Solutions.ru	Market Access Solutions
www. izdat-Oki	Издательство ОКИ

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Статистическая обработка результатов фармакологических экспериментов, измеренных в порядковых и количественных шкалах, при невозможности анализа с помощью параметрических методов
Цорин И.Б. *3*

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Влияние фармакокинетики и биодоступности цикло-L-пролилглицина на проявление его основных фармакологических эффектов у экспериментальных животных
Бойко С.С., Колясникова К.Н., Жердев В.П. *25*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Комбинированная оральная контрацепция и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19): вопросы взаимодействия лекарственных средств
Лиманова О.А., Громова О.А., Федотова Л.Э. *30*

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Сравнительное изучение нейропротекторной активности соединений лития и их влияния на течение экспериментального аллоксанового сахарного диабета у крыс
Назаренко О.А., Демидов В.И., Громова О.А., Алексахина Е.Л., Торшин И.Ю. *40*

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование иммунотоксичности пролонгированной формы препарата Афобазол
Коваленко Л.П., Журиков Р.В., Коржова К.В., Дурнев А.Д. *48*

Исследование субхронической токсичности препарата Дантинорм Бэби
Сорокина А.В., Алексеева С.В., Мирошкина И.А., Качалов К.С., Захаров А.Д., Алексеев И.В., Лапицкая А.С. *52*

СОДЕРЖАНИЕ

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS

№3
2020

Издательство
ОКИ

Chief editor
Zherdev Vladimir
Ph.D., Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Moscow

Deputy chief editor
Smirnov Valery
Ph.D., Moscow

Executive secretary
Litvin Alexander
Ph.D., Moscow

Editorial Board

Bondareva Irina
Ph.D., Moscow

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

Gromova Olga
Ph.D., Professor, Ivanovo

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

Kovalev Georgy
Ph.D., Professor, Moscow

Colic Larisa
Ph.D., Professor, Moscow

Kolyvanov Gennady
Ph.D., Moscow

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

Ramenskaya Galina
Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek
Ph.D., Professor, Moscow

Spasov Alexander
RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Smirnov Valery
Ph.D., Moscow

Starodubtcev Alex
Ph.D., Professor, Moscow

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

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

Shevchenko Roman
Ph.D., Moscow

Graduate group

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

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

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

Signed in print 23.12.2020 г. **Circulation** 400 copies.
Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com
115093, Moscow, Partiynyj pereulok, 1/58, bld. 3, office 11

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiiskay, 8
FSBI «ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY»
Tel./Fax: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Website: www.PharmacoKinetica.ru Journal «Pharmacokinetics and Pharmacodynamics» is a supplement to the journal «Good Clinical Practice». Journal «Good Clinical Practice» registered by Russian Committee for Press 28.05.2001 Certificate of registration of mass media PI №77-9142.

Copyring material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

Sites	Journals
www. Antibiotics-Chemotherapy.ru	Antibiotics and Chemotherapy
www. ClinVest.ru	Good Clinical Practice
www.Hospital-Apteka.ru	Digest «Hospital pharmacy»
www. PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru	Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

www. HealthEconomics.ru	Center of Pharmacoeconomics Research
www. Market-Access-Solutions.ru	Market Access Solutions
www. izdat-Oki.ru	Publisher OKI

CONTENTS

REVIEWS

Statistical processing of pharmacological experiments results measured in ordinal and quantitative scales, if it is impossible to analyze using parametric methods
Tsorin IB 3

PRECLINICAL PHARMACOKINETICS STUDIES

The influence of the pharmacokinetics and bioavailability of cyclo-L-propylglycine to the manifestation of its main pharmacological effects in experimental animals
Boyko SS, Koljasnikova KN, Zherdev VP 25

DRUG INTERACTIONS

Combined oral contraception and treatment of new coronavirus infection (COVID-19): drug interaction issues
Limanova OA, Gromova OA, Fedotova LE 30

PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

Comparative study of the neuroprotective activity of lithium compounds and their effect on the course of experimental alloxan diabetes mellitus in rats
Nazarenko OA, Demidov VI, Gromova OA, Aleksakhina EL, Torshin IYu 40

TOXICOLOGY STUDIES

Evaluation of immunotoxicity of the extended-release form of Afobazol
Kovalenko LP, Zhurikov RV, Korzhova KV, Durnev AD 48

Study the subchronic toxicity of the drug Dantinorm Baby
Sorokina AV, Alekseeva SV, Miroshkina IA, Kachalov KS, Zaharov AD, Alekseev IV, Lapizkaya AS 52

CONTENTS

Статистическая обработка результатов фармакологических экспериментов, измеренных в порядковых и количественных шкалах, при невозможности анализа с помощью параметрических методов

Цорин И. Б.

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

Аннотация. В статье рассматриваются описательная (дескриптивная) статистика данных, измеренных в порядковых (ординальных) и количественных шкалах, и критерии для определения статистической значимости различий между выборками при невозможности анализа с помощью параметрических методов. Особое внимание уделяется проблеме множественных сравнений такого рода данных. Для каждого метода приводятся примеры обработки данных, получаемых в фармакологических исследованиях.

Ключевые слова: порядковые шкалы; количественные шкалы; фармакологические исследования; множественные сравнения; дескриптивная статистика

Для цитирования:
Цорин И.Б. Статистическая обработка результатов фармакологических экспериментов, измеренных в порядковых и количественных шкалах, при невозможности анализа с помощью параметрических методов // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2020. – № 3. – С. 3–24. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-3-3-24

Statistical processing of pharmacological experiments results measured in ordinal and quantitative scales, if it is impossible to analyze using parametric methods

Tsorin IB

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The article discusses descriptive statistics of data measured in ordinal and quantitative scales, and criteria for determining the statistical significance of differences between samples when it is impossible to analyze using parametric methods. Special attention is paid to the problem of multiple comparisons of this type of data. For each method, examples of processing data obtained in pharmacological studies are given.

Keywords: ordinal scales; quantitative scales; pharmacological studies; multiple comparisons; descriptive statistics

For citations:
Tsorin IB. Statistical processing of pharmacological experiments results measured in ordinal and quantitative scales, if it is impossible to analyze using parametric methods. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(3):3–24. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-3-3-24

При проведении фармакологических исследований достаточно часто данные измеряют с помощью порядковых (ординальных) шкал, которые представляют собой разновидность качественных шкал. В порядковых шкалах измерения производятся в баллах, количестве плюсов (интенсивность окраски в гистологии) или в уровнях интенсивности процесса (лёгкая форма заболевания, средней тяжести, тяжёлая) [1, 2]. Иногда такие шкалы называют полуколичественными, однако такой термин является неприемлемым, так как это название не отражает их свойств. Исследователи, проводя статистическую обработку порядковых данных, часто не учитывают ограничения, которые имеет тот или иной статистический критерий. При этом ошибки допускаются уже в числовом описании полученных результатов. Точно такие же ошибки допускают исследователи, проводя обработку и описание количественных данных, в том случае, когда нельзя применить параметрические методы (t-критерий Стьюдента, дисперсионный анализ). Именно описанию и обработке такого рода данных и посвящена настоящая работа.

Свойства порядковых шкал и дескриптивная статистика

Порядковые (ординальные) шкалы, помимо распределения объектов по классам, позволяют упорядочить наблюдения, сравнивая их между собой в каком-то соотношении (лучше–хуже, больше–меньше). Например, степень тяжести патологического процесса, оцениваемая в баллах, интенсивность гистохимических реакций на срезах тканей, оцениваемая количеством плюсов, и т. д. Однако порядковые шкалы оценивают не дистанцию между классами, а только наличие разницы в выраженности процесса в наблюдениях. Поэтому над данными, описываемыми такого рода шкалами, даже если они имеют цифровое выражение, нельзя выполнять арифметические операции, так как они не являются числами в полном смысле этого

слова. Нельзя суммировать баллы, а следовательно, находить средний балл. Это связано с тем, что баллы — это всего лишь представленные в цифровой форме степени выраженности процесса у одного объекта по отношению к другим, при этом порой достаточно субъективные. Таким образом, в порядковой шкале, помимо частоты объектов в различных классах, можно определить ранг объекта [1, 2].

Пример 1. В экспериментах по изучению антиаритмического действия веществ во время окклюзии и реперфузии коронарной артерии у крыс животным присваивается определённое количество баллов в зависимости от тяжести аритмий. При ранжировании выборок (распределении объектов по нарастанию баллов) выявляют медиану баллов в каждой выборке и определяют в какой совокупности аритмии тяжелее (табл. 1).

Таблица 1

Балльное шкалирование тяжести аритмий у крыс в условиях окклюзии и реперфузии коронарной артерии

Table 1

Ball scaling of the severity of arrhythmias in rats under conditions of occlusion and reperfusion of the coronary artery

Виды аритмий	Количество баллов
Аритмии отсутствуют	0
Желудочковая экстрасистолия	1
Желудочковая тахикардия	2
Фибрилляция желудочков во время реперфузии коронарной артерии	3
Фибрилляция желудочков в течение окклюзии коронарной артерии	4

Как мы уже отметили выше, с данными, измеренными в порядковой шкале, никакие арифметические действия проводить нельзя, однако оценки, получаемые объектами изучения, можно ранжировать в порядке возрастания или убывания. В связи с вышесказанным для оценки математического ожидания (среднего) генеральной совокупности такого рода следует использовать выборочную медиану. Однако, если количество градаций порядковой шкалы менее 5, иногда следует перейти к категориальной (номинальной) шкале и указывать частоту градаций [2].

При проведении обработки количественных данных, имеющих распределение отличное от нормального и логнормального, исследователи часто описывают полученные результаты с помощью среднего арифметического, его стандартной ошибки и стандартного отклонения. Такой подход является ошибочным, так как эти показатели достаточно адекватно отражают математическое ожидание генеральной совокупности и вариацию показателя только в случае нормального распределения (случае логнормального распределения математическое ожидание генеральной совокупности отражает средняя геометрическая). В связи с изложенным, при описании такого рода данных следует использовать те же статистики, что и в случае порядковых шкал.

Медианой (Me) выборки называется значение варианты, делящей ранжированный несгруппированный ряд наблюдений на две равные части (приходящееся на середину ряда) [3–5].

Если количество наблюдений в ряду нечётное, то медиана равна варианте, имеющей номер $(n + 1)/2$. Если n чётное, то медиана равна полусумме вариант с номерами $n/2$ и $n/2 + 1$ [3–5].

Пример 2. На 7 гистологических срезах печени крыс с помощью порядковой шкалы оценивали выраженность жировой инфильтрации: 0 баллов — отсутствие жировых капель в поле зрения; 1 — одиночные мелкие капли жира; 2 — большое количество мелких капель жира; 3 — наличие одиночных крупных капель жира; 4 — большое количество крупных капель жира; 5 — разлитая жировая инфильтрация. При оценке срезов были получены следующие результаты: 0; 1; 3; 3; 4; 4; 4. Так как выборка имеет нечётное количество вариант, то Me при ранжировании по возрастанию равна варианте с номером $(n + 1)/2 = 4$, следовательно Me = 3.

Пример 3. У 8 крыс измерили массу тела, которая оказалась равна 225; 230; 300; 325; 400; 420; 475 и 500 г. Необходимо вычислить медиану. Так как количество вариант чётное ($n = 8$), то медиана будет равна полусумме 4-й и 5-й вариант, т. е. $Me = (x_4 + x_5)/2 = (325 + 400)/2 \approx 363$ г .

Для оценки вариации показателей, измеренных в порядковых шкалах, используют квантили (наиболее часто квартили).

Квантилями называются статистики, отсекающие в пределах ряда определённую часть его членов [4].

Иначе. Кванти́ль — значение, которое заданная случайная величина не превышает с фиксированной вероятностью.

К ним относятся: квартили — три значения признака, которые делят ранжированный ряд на четыре равные части (по 25 % значений в каждой), децили — 9 значений, делящих ряд на 10 частей, перцентили (процентили) — 99 значений, делящие ряд на 100 частей.

На практике чаще всего используют квантили P_3; P_5; P_{10}; P_{25}; P_{50}; P_{75}; P_{90}; P_{95}; P_{97}. P_{50} является вторым квартилем и равен медиане. P_{25} и P_{75} соответствуют первому (нижнему) и третьему (верхнему) квартилям, между которыми находится 50 % членов выборки. Именно нижний и верхний квартили и межквартильный размах используют в качестве показателей вариации порядковых признаков. Эти же показатели используют при оценке вариации количественных признаков, распределение которых значительно отличается от нормального и логнормального [4, 5].

Как и большинство разбираемых статистик, квантили в настоящее время рассчитывают с помощью пакетов статистических программ. Для вычисления вручную квантилей малых выборок, не сгруппиро-

ванных в вариационный ряд, используют следующий подход. Варианты сортируют в порядке возрастания. Весь объём выборки принимают за 100 % и определяют скольким процентам соответствует одна варианта. Затем строят таблицу кумуляции частот (%). После этого выбирают варианту, которая соответствует большей накопленной частоте, чем выбранный порядок квантиля, так, чтобы предыдущая была меньше. Именно большая из 2 вариант соответствует этому квантилю. Если накопленная частота меньшей из этих 2 вариант соответствует выбранному порядку квантиля, то этот показатель равен среднему арифметическому 2 вариант [4].

Пример 4. У 2 выборок крыс с 10-минутной окклюзией и последующей реперфузией коронарной артерии с помощью порядковой шкалы оценивали тяжесть аритмий (см. пример 1). В первой выборке было 11 крыс, во второй 8. Результаты измерений оказались следующими. I выборка: 0; 1; 2; 2; 3; 3; 3; 3; 4; 4; 4. II выборка: 0; 0; 2; 3; 3; 3; 3; 4. Необходимо рассчитать медианы, нижний и верхний квартили.

I выборка:
I selection:

Тяжесть аритмий в баллах	**0**	**1**	**2**	**2**	**3**	**3**	**3**	**3**	**4**	**4**	**4**
%	9,09	18,18	27,27	36,36	45,45	54,54	63,63	72,72	81,81	90,90	100

Me = 3; P_{25} = 2; P_{75} = 4

II выборка:
II selection:

Тяжесть аритмий в баллах	**0**	**0**	**2**	**3**	**3**	**3**	**3**	**4**
%	12,5	25,0	37,5	50,0	62,5	75,0	87,5	100

Me = 3; P_{25} = 1; P_{75} = 3

Рассчитав точечные характеристики изучаемой выборки, можно построить доверительный интервал, в котором с той или иной вероятностью находится генеральный параметр. Наиболее часто в качестве доверительных используют вероятности $P_1 = 0{,}95$, $P_2 = 0{,}99$. Это означает, что при оценке параметров генеральной совокупности по выборочным показателям вероятность ошибки составляет 5 % в первом случае и 1 % во втором. Выбор порога доверительной вероятности исследователь осуществляет, исходя из той ответственности, с какой делаются выводы о генеральных параметрах.

С доверительной вероятностью связан уровень значимости α, который равен 1-P. Геометрически эту величину можно представить как площадь под кривой распределения некоторой статистики, выходящую за пределы, которые ограничивают P % площади под этой кривой [4–6].

Для оценки доверительного интервала медианы выборка ранжируется в порядке возрастания. Если объём выборки не превышает 50 вариант, то по таблице [2, 7, 8] в соответствии с n и уровнем доверительной вероятности ($P = 1 - \alpha$) определяют номера вариант, которые являются границами доверительного интервала медианы. Например, для выборки, состоящей из 10 вариант, границами 95 % доверительного интервала служат 2-я и 9-я варианты. Если $n > 50$, то доверительный интервал медианы определяется следующим образом:

$$x_k \le \mathrm{Me} \le x_{n-k+1},$$

где: $k = (n - z_{\alpha/2}*\sqrt{(n-1)})/2$, $z_{\alpha/2}$ – $(1 - \alpha/2)$ квантиль верхнего хвоста стандартного нормального распределения [2].

Например, при выборке из 100 вариант и 95 % доверительном интервале ($\alpha = 0{,}05$) $k = (100 - 1{,}96*\sqrt{(100-1)})/2 = 40{,}2$, тогда $x_{40} \le \mathrm{Me} \le x_{61}$.

Проверка гипотез об однородности двух выборок, распределённых по закону, отличающемуся от нормального (логнормального), или измеренных в порядковых шкалах

В фармакологических исследованиях очень часто возникает необходимость оценить различия между выборками, в которых оцениваемые показатели измерены в порядковой шкале или полученные количественные результаты имеют распределение, значительно отличающееся от нормального или логнормального. В частности, такие выборки встречаются при изучении влияния фармакологических веществ на поведение животных.

Для обработки такого рода данных используют различные непараметрические методы, которые независимы от распределения. Блок-схема алгоритма выбора метода приведена на рисунке 1, объяснения к нему см. далее в тексте.

Сравнение двух независимых выборок

Одним из наиболее часто применяемых для сравнения двух независимых выборок методов является **критерий Вилкоксона–Манна–Уитни**. Критерий, как и многие непараметрические методы, является ранговым. Каждой варианте выборок присваивается определённый ранг, который соответствует её положению в общем ряду вариант обеих выборок после сортировки по возрастанию. Равным вариантам присваиваются средние значение тех рангов, которые были бы присвоены каждому из членов выборки при отсутствии совпадений. Сумма рангов в ряду равна $N \times (N + 1)/2$.

Пример 5.

Вариант	0	1	2	2	4	5	5
Ранг	1	2	3,5	3,5	5	6,5	6,5

Проверим правильность ранжирования: сумма рангов $R = 1 + 2 + 3{,}5 + 3{,}5 + 5 + 6{,}5 + 6{,}5 = 28$; $R = N \times (N + 1)/2 = 7(7 + 1)/2 = 28$, где N — количество вариант в выборке.

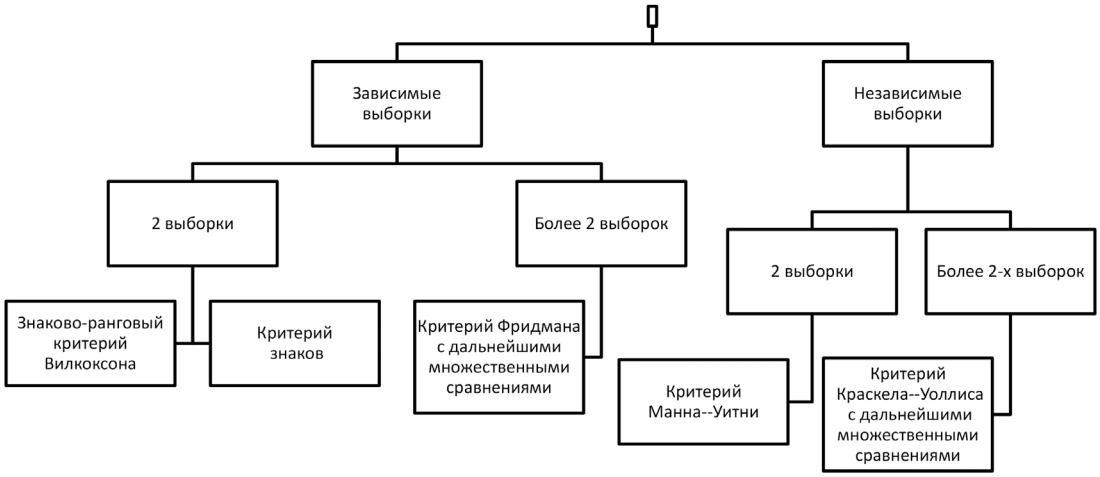


Рис. 1. Блок-схема выбора метода обработки данных, измеренных в порядковой шкале.
Figure 1. Flowchart for selecting a method for processing data measured on an ordinal scale.

Критерий **Вилкоксона–Манна–Уитни** используется для оценки значимости различий между медианами совокупностей, варианты которых измерены в порядковых или количественных шкалах. Нулевая гипотеза H_0 предполагает, что выборки извлечены из одной генеральной совокупности и различий между медианами не существует, т. е. изучаемое воздействие не вызывает сдвига ($d = \mu_1 - \mu_2 = 0$, где μ_1 и μ_2 медианы совокупностей). Альтернативная гипотеза H_1 — выборки извлечены из разных генеральных совокупностей, медианы не равны.

Анализ данных с помощью критерия **Вилкоксона–Манна–Уитни** [6] проводится следующим образом: выборки X и Y объёмом n и m объединяют и сортируют по возрастанию, сохраняя при этом соответствие между отдельными вариантами и связанными с ними экспериментальными условиями; присваивают членам объединённой выборки соответствующие ранги; отделяют одну выборку от другой. Находят для каждой из них сумму рангов $\left(R_n = \sum_{i=1}^{n} r_i \text{ и } R_m = \sum_{j=1}^{m} r_j \right)$. Затем рассчитывают тестовые статистики (можно рассчитывать какую-либо одну, например, для выборки Y)

$$U_n = n \times m + n \times (n + 1)/2 - R_n, \quad (1)$$

$$U_m = n \times m + m \times (m + 1)/2 - R_m, \quad (2)$$

Эти два показателя связаны между собой следующим соотношением:

$$U_n = n \times m - U_m, \quad (3)$$

Рассчитанные статистики сравнивают с критическими значениями $U_{кр.min}$ и $U_{кр.max}$ при соответствующих n, m и уровне значимости α, которые приведены в соответствующих таблицах [6, 7]. H_0 отвергают в пользу односторонней H_1 $d > 0$, если $U_m \le U_{кр\alpha.n,m,min}$; односторонней H_1 $d < 0$, если $U_m \ge U_{кр,\alpha.n,m,max}$; двухсторонней H_1 $d \ne 0$, если $U_m \ge U_{кр.,\alpha/2,n,m,max}$ или $U_m \le U_{кр.,\alpha/2,n,m,min}$, в противных случаях принимают H_0. U_n будет зеркально отражать положение U_m.

Этот критерий можно применять при $n, m \ge 3$ или $n = 2, m \ge 5$. В том случае, если численность одной из выборок превышает максимальное n, m используемой таблицы, следует применить приближение для больших выборок.

Наиболее точной является аппроксимация, предложенная *Jman RL* [9]. Согласно этому приближению H_0 отклоняется на уровне значимости α, если $|J| \ge J(\alpha)$ или $|J| \ge J(\alpha/2)$ при односторонней и двухсторонней гипотезах, соответственно, где:

$$J = \frac{W}{2}\left[1 + \left(\frac{n+m-2}{n+m-1-W^2}\right)^{1/2}\right]; \quad J(\alpha) = \frac{z_\alpha}{2} + \frac{t_\alpha(\nu)}{2}, \quad (4)$$

где: z_α – $(1 - \alpha)$-квантиль верхнего хвоста стандартного нормального распределения; $t_\alpha(\nu)$ — α-квантиль распределения Стьюдента с $\nu = n + m - 2$ степенями свободы (значения квантилей для стандартных α даны в соответствующих таблицах)

$$W = \frac{R_m - \frac{m(n+m+1)}{2}}{\sqrt{\frac{nm(n+m+1)}{12}}} \text{ или } W = \frac{R_n - \frac{n(n+m+1)}{2}}{\sqrt{\frac{nm(n+m+1)}{12}}}, \quad (5)$$

Если в двух анализируемых выборках есть совпадающие значения, то знаменатель статистики W умножают на следующую величину:

$$\sqrt{1 - \frac{\sum_{i=1}^{k} t_i(t_i^2 - 1)}{(m+n)(m+n-1)(m+n+1)}}, \quad (6)$$

где: k — общее число групп совпадающих вариант; t_i — число совпавших величин в i-й группе (необходимо подчеркнуть, что поправка вносится только тогда, когда совпавшие величины принадлежат к разным

выборкам, т. е. группы совпадающих вариант, целиком состоящие из элементов одной и той же выборки, на величину W не влияют).

Пример 6. На лабораторных мышах изучали влияние нового препарата на неспособность удерживать задние лапы под туловищем, вызываемую этиловым спиртом. Показатель оценивали в баллах табл. 2 [10]. Полученные данные представлены в табл. 3.

H_0: выборки извлечены из одной генеральной совокупности, препарат не влияет на нарушения координации движений, вызываемые этанолом($d = 0$).

H_1: выборки извлечены из разных генеральных совокупностей, препарат уменьшает тяжесть нарушений координации движений ($d < 0$).

Уровень значимости $\alpha = 0{,}05$.

Таблица 2

Порядковая шкала неспособности удерживать задние лапы под туловищем

Table 2

Ordinal scale of inability to hold the hind legs under the body

Баллы	Характеристика
0	«Раскидывание» лап не наблюдается
1	Кратковременное эпизодическое «раскидывание» лап во время движения
2	Повторяющиеся «раскидывания» лап, способность двигаться по прямой линии
3	Постоянное «раскидывание» лап, ограниченная координация (часто движение по кругу)
4	Постоянное «раскидывание» лап, безуспешные попытки к движению
5	Постоянное «раскидывание» лап, отсутствие попыток к движению

Таблица 3

Table 3

Выборка	Неспособность удерживать задние лапы под туловищем, баллы
Контроль, $n = 6$	2; 3; 3; 4; 5;5;
Опыт, $m = 7$	0; 1; 1; 2; 2; 3; 4

Для статистической обработки с помощью критерия Вилкоксона–Манна–Уитни объединяем выборки, сортируем варианты по возрастанию и присваиваем им ранги (табл. 4). Суммируем ранги по

Таблица 4

Table 4

Выборка	Варианта	Ранг	Выборка	Варианта	Ранг
Опыт	0	1	Контроль	3	8
Опыт	1	2,5	Опыт	3	8
Опыт	1	2,5	Опыт	4	10,5
Опыт	2	5	Контроль	4	10,5
Контроль	2	5	Контроль	5	12,5
Опыт	2	5	Контроль	5	12,5
Контроль	3	8			

выборкам: $R_n = \sum_{i=1}^{n} r_i = 5 + 8 + 8 + 10{,}5 + 12{,}5 + 12{,}5 = 56{,}5;$

$R_m = \sum_{j=1}^{m} r_j = 1 + 2{,}5 + 2{,}5 + 5 + 5 + 8 + 10{,}5 = 34{,}5.$

Откуда в соответствии с (1) и (2) $U_n = 6 \cdot 7 + 6 \cdot (6 + 1)/2 - 56{,}5 = 6{,}5$; $U_m = 6 \cdot 7 + 7 \cdot (7 + 1)/2 - 34{,}5 = 35{,}5$. Следовательно, $U_m = 35{,}5 > U_{\text{кр.max, 0,05; 6; 7}} = 34$. Таким образом, H_0 $d = 0$ можно отклонить в пользу альтернативной гипотезы $d < 0$.

Пример 7. На лабораторных крысах изучали влияние нового препарата на детоксикационную функцию печени, о которой судили по длительности гексеналового сна. Полученные данные представлены в табл. 5.

Таблица 5

Table 5

Выборка	Продолжительность гексеналового сна, мин
Контроль, $n = 6$	38,5; 39,3; 40,3; 42,1; 44,8; 45,0
Опыт, $m = 7$	34,1; 37,5; 38,0; 38,4; 39,0; 40,3; 41,0

H_0: выборки извлечены из одной генеральной совокупности, препарат не влияет на продолжительность гексеналового сна ($d = 0$).

H_1: выборки извлечены из разных генеральных совокупностей, препарат уменьшает продолжительность гексеналового сна ($d < 0$).

Уровень значимости $\alpha = 0{,}05$.

Для статистической обработки с помощью критерия Вилкоксона–Манна–Уитни объединяем выборки, сортируем варианты по возрастанию и присваиваем им ранги (табл. 6).

Таблица 6

Table 6

Выборка	Варианта	Ранг
Опыт	34,1	1
Опыт	37,5	2
Опыт	38,0	3
Опыт	38,4	4
Контроль	38,5	5
Опыт	39,0	6
Контроль	39,3	7
Контроль	40,3	8,5
Опыт	40,3	8,5
Опыт	41,0	10
Контроль	42,1	11
Контроль	44,8	12
Контроль	45,0	13

Суммируем ранги по выборкам: $R_n = \sum_{i=1}^{n} r_i =$

$= 5 + 7 + 8{,}5 + 11 + 12 + 13 = 56{,}5$; $R_m = \sum_{j=1}^{m} r_j = 1 + 2 +$

+ 3 + 4 + 6 + 8,5 + 10 = 34,5. Откуда в соответствии с (1) и (2) $U_n = 6{\cdot}7 + 6{\cdot}(6 + 1)/2 - 56{,}5 = 6{,}5$; $U_m = 6{\cdot}7 + 7{\cdot}(7 + 1)/2 - 34{,}5 = 35{,}5$. Следовательно, $U_m = 35{,}5 > U_{\text{кр.max, 0,05;6;7}} = 34$. Таким образом, H_0 $d = 0$ можно отклонить в пользу альтернативной гипотезы $d < 0$.

Так как критерий Вилкоксона–Манна–Уитни, как и большинство непараметрических критериев, основан на сравнении медиан, сравниваемые выборки описывают с помощью медиан, 25 и 75 % процентилей (верхнего и нижнего квартилей). В то же время, если признак измерен в количественной шкале, то можно рассчитать сам сдвиг, вызванный изучаемым воздействием [3, 11].

Для выполнения этого расчёта необходимо построить $n \times m$ разностей $Y_j - X_i$, где $i = 1, ..., n$; $j = 1, ..., m$. Полученный ряд сортируют по возрастанию и вычисляют оценку d, связанную со статистикой ранговой суммы Вилкоксона, которая равна медиане этого ряда:

$$d = \text{Me}\{(Y_j - X_i),\ i = 1, ..., n;\ j = 1, ..., m\}, \qquad (7)$$

Если члены упорядоченного ряда представить как $V^{(1)} \le ... \le V^{(n \times m)}$, то при $m \times n$ нечётном ($m \times n = 2k + 1$) $d = V^{(k+1)}$. Если $m \times n$ чётное ($m \times n = 2k$), то $\hat{d} = (V^{(k)} + V^{(k+1)})/2$.

Пример 8. Используем данные примера 7, получим 42 упорядоченные разности $(Y_j - X_i)$, где $j = 1$, $i = 1, ..., 6$, т. е. $V^{(1)} \le ... \le V^{(42)}$: –10,9; –10,7; –8,1; –7,5; –7,3; –7,0; –6,8; –6,6; –6,4; –6,2; –6,0; –5,8; –5,2; –4,7; –4,5; –4,6; –4,4; –4,1; –4,0; –3,8; –3,7; –3,1; –2,8; –2,3; –1,9; –1,8; –1,8; –1,3; –1,3; –1,1; –1,0; –0,9; –0,5; –0,3; –0,1; 0,0; 0,5; 0,7; 1,0; 1,7; 1,8; 2,5.

Из этого ряда мы получаем: $d = (V^{(21)} + V^{(22)})/2 = (-3{,}7 - 3{,}1)/2 = -3{,}4$ мин составляет уменьшение гексеналового сна под влиянием препарата.

Для сдвига можно определить его свободный от распределения доверительный интервал [3, 12].

Для построения симметричного доверительного интервала для d с коэффициентом доверия $1 - \alpha$ надо выполнить следующие действия.

1. Найти целое число

$$C_\alpha = U_{\text{кр.},\alpha/2,n,m,\min} + 1, \qquad (8)$$

Тогда

$$P_0 = \{[n(n + 1)/2 + C_\alpha] \le R_n \le [(n(2m + n + 1)/2 - C_\alpha]\} = 1 - \alpha\ (m \ge n), \qquad (9)$$

2. Необходимо провести сортировку разностей $Y_j - X_i$, где $i = 1, ..., n$; $j = 1, ..., m$, так, чтобы $V^{(1)} \le ... \le V^{(n \times m)}$.

3. Границы доверительного интервала $1 - \alpha$ будут равны:

$$d_L = V^{(C\alpha)};\ d_U = V^{(mn + 1 - C\alpha)}, \qquad (10)$$

Тогда для всех d получаем

$$P_d\{d_L < d < d_U\} = 1 - \alpha, \qquad (11)$$

Для больших n и m целое число C_α можно рассчитать с помощью аппроксимации стандартным нормальным распределением:

$$C_\alpha \approx \frac{mn}{2} - z_{(\alpha/2)}\left(\frac{mn(m+n+1)}{12}\right)^{1/2}, \qquad (12)$$

где: $z(\alpha/2) - (1 - \alpha/2)$ квантиль верхнего хвоста стандартного нормального распределения.

Если при расчёте получается не целое число, то его необходимо округлить до целого.

Пример 9. Возьмём данные о продолжительности гексеналового сна из примеров 8 и 7, рассчитаем 90 % доверительный интервал. В этом случае $U_{\text{кр.},\alpha/2,n,m,\min} = U_{\text{кр.},0,05,6,7,\min} = 8$, тогда по формуле (8) рассчитаем $C_\alpha = U_{\text{кр.},0,05,6,7,\min} + 1 = 9$. Следовательно, $d_L = V^{(C\alpha)} = V^{(9)}$; $d_U = V^{(nm + 1 - C\alpha)} = V^{(34)}$. Из ряда 42 упорядоченных разностей $Y_j - X_i$, где $j = 1, ...$; $i = 1, ..., 6$ ($V^{(1)} \le ... \le V^{(42)}$: –10,9; –10,7; –8,1; –7,5; –7,3; –7,0; –6,8; –6,6; –6,4; –6,2; –6,0; –5,8; –5,2; –4,7; –4,5; –4,6; –4,4; –4,1; –4,0; –3,8; –3,7; –3,1; –2,8; –2,3; –1,9; –1,8; –1,8; –1,3; –1,3; –1,1; –1,0; –0,9; –0,5; –0,3; –0,1; 0,0; 0,5; 0,7; 1,0; 1,7; 1,8; 2,5), в соответствии с (10) находим, что $d_L = -6{,}4$, $d_U = -0{,}3$. Таким образом, уменьшение изучаемого признака под влиянием препарата с вероятностью 0,90 находится в интервале от –6,4 мин до –0,3 мин.

Значительно реже по сравнению с критерием Вилкоксона–Манна–Уитни, используют **медианный критерий**, который обладает значительно меньшей мощностью [6].

С помощью медианного критерия проверяется нулевая гипотеза о том, отобраны ли две выборки из генеральных совокупностей с одинаковыми медианами. Этот критерий пригоден для обработки данных, измеренных в порядковой или количественных шкалах. Данный критерий достаточно прост, его можно описать следующим образом: все результаты измерений объединяются в один ряд, который сортируется по возрастанию или убыванию; находится общая медиана; для каждого условия определяется число отметок, находящихся выше или ниже общей медианы; эти данные записываются в таблицу сопряжённости признаков 2X2, и далее оценивается статистическая значимость различий с помощью метода точной вероятности Фишера или критерия χ^2 для 2 выборок (эти методы были разобраны в предыдущей статье [13]). Выборки следует описывать с помощью медиан и нижнего, и верхнего квартилей.

Для сравнения двух независимых выборок измеренных в любой количественной шкале может быть использован **критерий рандомизации** [6]. Этот критерий является одним из наиболее мощных непараметрических методов для сравнения двух выборок, измеренных в истинно количественных шкалах. К сожалению, он очень трудоёмок, это ограничивает его использование (в распространённых программных пакетах этот метод не разработан). Из-за трудоёмкости этот критерий может быть использован только для сравнения маленьких выборок (при количестве вариант в выборках не более 10). В качестве H_0 принимается

предположение о том, что анализируемые выборки извлечены из генеральных совокупностей с равными математическими ожиданиями и все видимые различия случайны; H_1-математические ожидания этих совокупностей действительно различны.

Суть метода заключается в следующем:

1. Вычисляют общее количество различных комбинаций, полученных данных в выборках. Число возможных исходов рассчитывают по формуле:

$$J = \frac{(n+m)!}{n!m!},$$

где: n и m — количество вариант в выборках; ! — (факториал) указывает на необходимость перемножить все целые числа от 1 до n (по соглашению 0! = 1).

2. Путём перебора определяют количество (G) столь же и ещё менее вероятных исходов распределения вариант по выборкам, чем наблюдаемый.

3. Рассчитывают вероятность получения исхода, столь же или ещё менее вероятного, чем наблюдаемый $\left(P = \frac{G}{J}\right)$.

Определение количества различных исходов может оказаться довольно утомительным занятием, однако при систематическом подходе эту процедуру можно минимизировать.

Например, можно использовать такой подход.

Пример 10. Пусть имеются 2 выборки А и Б, содержащие 3 и 4 варианты, соответственно:

А	Б
5	6
8	7
9	10
	12

1. Найдем количество возможных исходов распределения данных чисел по выборкам $J = \frac{(n+m)!}{n!m!} = \frac{(3+4)!}{3!4!} = 35.$

2. Находим сумму для каждой выборки: ΣА = 22 и ΣБ = 35.

3. Обратимся к выборке с меньшей суммой. Перечислим все комбинации по 3 из имеющихся чисел, сумма которых не будет превышать этой меньшей суммы: 5 + 8 + 9 = 22; 5 + 6 + 9 = 20; 5 + 8 + 6 = 19; 5 + 6 + 10 = 21; 6 + 7 + 9 = 22; 6 + 8 + 7 = 21; 5 + 6 + 7 = 18; 5 + 7 + 9 = 21; 5 + 7 + 10 = 22; 5 + 8 + 7 = 20. Итак, получилось 10 комбинаций, сумма которых не превышает 22.

4. Находим вероятность получения суммы, меньшей или равной минимальной из наблюдаемых сумм:

$$P_{\Sigma A \le 22} = \frac{G}{J} = \frac{10}{35} \approx 0,286.$$

Это — односторонняя вероятность наступления события столь же или более редкого, чем получение суммы 22 в комбинации 3 чисел из приведённых 7. Для определения двухсторонней вероятности наступления подобного события (при котором Б может иметь большую сумму) нужно увеличить одностороннее значение вероятности в 2 раза. Таким образом, вероятность наступления события столь же редкого, как наблюдаемый результат, равна 0,572, т. е. H_0 о том, что выборки взяты из одной совокупности, отвергнуть нельзя.

Таблица 7

Влияние вещества Х на минутный объём сердца (мл/мин) в условиях экспериментального инфаркта миокарда

Table 7

Effect of substance X on the minute volume of the heart (ml/min) in experimental myocardial infarction

Контроль n = 3	Опыт m = 5
35	39
38	44
43	45
	48
	50

Пример 11. У крыс с экспериментальным инфарктом миокарда изучали влияние вещества на минутный объём сердца (мл/мин) в условиях 10-дневного введения. Данные представлены в таблице 7.

H_0: Средние значения минутного объёма сердца в генеральных совокупностях, из которых извлечены выборки, совпадают ($\mu_1 = \mu_2$).

H_1: Средние значения минутного объёма сердца в изучаемых совокупностях различны ($\mu_1 \neq \mu_2$).

Поскольку принять решение о нормальности распределения исходных совокупностей данных затруднительно, и показатель измерен в количественной шкале, подходящим критерием для решения вопроса о значимости различий является двухсторонний критерий рандомизации с уровнем значимости $\alpha = 0,05$.

1. Общее число возможных исходов при 2 группах, для которых n = 3 и m = 5, равно: $J = \frac{(3+5)!}{3!5!} = 56.$

2. Находим сумму для каждой выборки: ΣК = 116 и ΣО = 226.

3. Перечисляем все комбинации наблюдаемых чисел, которые приводят к получению суммы, не превышающей ΣК = 116. Эти исходы выглядят следующим образом: 35 + 38 + 43 = 116; 35 + 38 + 39 = 112.

Таких комбинаций получилось 2.

4. Находим вероятность получения суммы, не превосходящую меньшую из наблюдаемых:

$$P_{\Sigma K \le 116} = \frac{2}{56} \approx 0,0357.$$

5. Двухстороннее значение вероятности:

$$P_{\Sigma K \le 116 \text{ или } \Sigma O \ge 226} = 4/56 \approx 0,0714.$$

Таким образом, мы не можем отвергнуть H_0 при $\alpha = 0,05$ и делаем вывод о том, что эффект вещества не доказан.

Сравнение двух зависимых выборок

Одним из наиболее часто применяемых для анализа зависимых выборок (с попарно связанными вариантами) методов является **независимый от распределения критерий знаковых рангов Вилкоксона** [3, 6].

Предположим, что у нас есть 2 равновеликие выборки случайных величин X и Y, являющихся одной и той же характеристикой изучаемых объектов до и после «обработки», измеренных в порядковой или количественных шкалах.

Тогда $Z_i = Y_i - X_i = d + e_i$, $i = 1, ..., n$,

где: e_i — ненаблюдаемые взаимно независимые случайные величины, принадлежащие непрерывной совокупности, симметричной относительно 0; d — неизвестный сдвиг, вызываемый «обработкой».

H_0 гласит: $d = 0$.

Для того, чтобы проверить эту гипотезу, необходимо провести сортировку по возрастанию абсолютных величин разностей $|Z_i|$. Если среди этих разностей есть $Z_i = 0$, их следует отбросить, уменьшив соответственно n до числа ненулевых значений. Оставшимся разностям следует присвоить ранги (в случае равенства значений используют средние ранги). Ранги положительных разностей суммируют: $T^+ = \sum r_i^+$.

T^+ сравнивают с критическим значениям $t_{\alpha, n}$ при соответствующем n и уровне значимости α, которые приведены в соответствующей таблице [3, 7, 14]. H_0 отвергают в пользу односторонней H_1 $d > 0$, если $T^+ \geq t_{\alpha, n}$; односторонней H_1 $d < 0$, если $T^+ \leq n(n+1)/2 - t_{\alpha, n}$, двухсторонней H_1 $d \neq 0$, если $T^+ \geq t_{\alpha 1, n}$ или $T^+ \leq \leq n(n+1)/2 - \leq t_{\alpha 2, n}$ $\alpha = \alpha 1 + \alpha 2$, в противных случаях принимают H_0.

Этот критерий можно применять при $n \geq 4$ (после исключения нулевых значений). В том случае, если $n > 20$, можно применить приближение для больших выборок.

Наиболее точной является аппроксимация, предложенная [15]. Согласно этому приближению, H_0 отклоняется на уровне значимости α, если $|J| \geq J(\alpha)$ или $|J| \geq J(\alpha/2)$ при односторонней и двухсторонней гипотезах, соответственно, где:

$$J = \frac{T^*}{2}\left[1 + \left(\frac{n-1}{n-(T^*)^2}\right)^{1/2}\right]; \quad J(\alpha) = \frac{z_\alpha}{2} + \frac{t_\alpha(\nu)}{2}, \quad (13)$$

где: $z_\alpha - (1 - \alpha)$-квантиль верхнего хвоста стандартного нормального распределения; $t_\alpha(\nu) - \alpha$-квантиль распределения Стьюдента с $\nu = n - 1$ степенями свободы.

В случае наличия совпадающих вариант вычисляют

$$T^* = \frac{T^+ - \frac{n(n+1)}{4}}{\sqrt{\frac{n(n+1)(2n+1) - 0{,}5\sum_{i=1}^{g} t_i(t_i-1)(t_i+1)}{24}}}, \quad (14)$$

где: g — общее число групп совпадающих вариант; t_i — число совпавших величин в i-й группе. Если совпадающих вариант нет, выражение под знаком Σ равно 0.

Пример 12. На 8 крысах изучали влияние препарата А на атаксию, вызываемую этанолом. Атаксию оценивали по неустойчивости походки до и после введения препарата А. Атаксию оценивали с помощью порядковой шкалы (табл. 8) [10]. Полученные данные представлены в табл. 9.

Таблица 8

Порядковая шкала оценки неустойчивости походки

Table 8

Ordinal scale for assessing gait instability

Баллы	Характеристика
0	Отсутствие покачивания
1	Покачивание при движении и на месте
2	Покачивания и падения
3	Падение из стороны в сторону, отсутствие движения
4	Падение, неспособность подняться

Таблица 9

Table 9

№	Оценка атаксии, баллы			Ранг
	До введения п-та	После введения п-та	Изменение (сдвиг), Z_i	
1	3	1	–2	4,5
2	4	3	–1	2
3	3	0	–3	6,5
4	4	4	0	–
5	3	2	–1	2
6	4	1	–3	6,5
7	3	4	+1	2
8	2	0	–2	4,5

H_0: Сдвиг $d = 0$.

H_1: Сдвиг $d < 0$.

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

Так как выборки измерены в порядковой шкале и являются зависимыми, то подходящим критерием для решения вопроса о статистической значимости сдвига является знаково-ранговый односторонний критерий Вилкоксона с уровнем значимости 0,05. В одном из оцениваемых случаев выраженность атаксии не меняется ($Z_4 = 0$), в связи с этим $n = 7$.

$$T^+ = 2 = n(n+1)/2 - t_{0{,}023;\,7} = 28 - 26 = 2.$$

Таким образом, на уровне значимости 0,023 следует отвергнуть H_0 и полагать, что препарат А статистически значимо уменьшает явления атаксии.

Пример 13. На 7 кошках изучали влияние пропранолола на подъём сегмента ST на эпикардиальной электрограмме, вызванный 3-минутной окклюзией передней нисходящей ветви левой коронарной артерии. Результаты представлены в табл. 10.

Так как выборки отличаются от нормального и логнормального распределений и являются зависимыми, то подходящим критерием для решения вопроса о статистической значимости сдвига является знаково-ранговый односторонний критерий Вилкоксона с уровнем значимости 0,05.

$$T^+ = 1{,}5 < n(n+1)/2 - t_{0{,}023;7} = 28 - 26 = 2.$$

Таблица 10

Влияние пропранолола (0,5 мг/кг, в/в) на подъём сегмента ST на эпикардиальной электрограмме кошек, вызванный 3-минутной окклюзией коронарной артерии

Table 10

Effect of propranolol (0.5 mg / kg, IV) on ST segment elevation on the cat epicardial electrogram caused by 3-minute coronary artery occlusion

№	Подъём сегмента ST, мв		Изменение (сдвиг) Z	Ранг
	До введения вещества	После введения вещества		
1	8	6	-2	3,5
2	10	9	-1	1,5
3	12	9	-3	5
4	13	8	-5	7
5	10	11	1	1,5
6	7	5	-2	3,5
7	14	10	-4	6

H_0: Сдвиг $d = 0$.

H_1: Сдвиг $d < 0$.

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

Таким образом, на уровне значимости 0,023 следует отвергнуть H_0 и полагать, что препарат уменьшает подъём сегмента ST, вызванный окклюзией коронарной артерии.

Как и в случае анализа с помощью критерия Вилкоксона–Манна–Уитни при использовании критерия знаковых рангов Вилкоксона выборки описывают с помощью медиан и нижнего, и верхнего квартилей. Вместе с тем, при измерении показателя в количественных шкалах можно оценить непосредственно величину сдвига, вызываемого изучаемым воздействием [3, 11].

С этой целью строят ряд из $M = n(n + 1)/2$ средних $(Z_i + Z_j)/2$, $i \le j = 1, ..., n$. Полученный ряд сортируют по возрастанию. Вычисляют оценку сдвига, связанную со статистикой знаковых рангов Вилкоксона, которая равна медиане этого ряда:

$$\hat{d} = Me\left\{\frac{Z_i + Z_J}{2},\ i \le j\right\}, \qquad (15)$$

Медиану рассчитывают так, как было описано выше.

Пример 14. Возьмем данные из примера 11. Для них имеем $M = n(n + 1)/2 = 7(7 + 1)/2 = 28$ упорядоченных значений $(Z_i + Z_j)/2$, т. е. $W^{(1)} \le ... \le W^{(28)}$, представляют следующий ряд: –5,0; –4,5; –4,5; –4,0; –4,0; –3,5; –3,5; –3,0; –3,0; –3,0; –3,0; –2,5; –2,5; –2,5; –2,0; –2,0; –2,0; –2,0; –2,0; –1,5; –1,5; –1,5; –1,0; –1,0; –0,5; –0,5; 0,0; 1,0. Так как в ряду чётное количество членов $M = 2k = 28$, то:

$$\hat{d} = \frac{W^{(k)} + W^{(k+1)}}{2} = \frac{W^{(14)} + W^{(15)}}{2} = \frac{-2{,}5 - 2{,}0}{2} \approx -2{,}3 \text{ мв}.$$

Для сдвига можно определить его свободный от распределения доверительный интервал [3].

Для построения симметричного доверительного интервала для d с коэффициентом доверия $1 - \alpha$ надо выполнить следующие действия:

1. Найти целое число

$$C_\alpha = \frac{n(n-1)}{2} + 1 - t_{a/2,n}, \qquad (16)$$

где: $t_{a/2,n}$ — критическое значение критерия Вилкоксона, тогда

$$P_0\left\{C_\alpha \le T^+ \le \left[\frac{n(n-1)}{2} - C_\alpha\right]\right\} = 1 - \alpha. \qquad (17)$$

2. Провести сортировку по возрастанию величин $(Z_i + Z_j)/2$ при $i \le j = 1, ..., n$, получив, таким образом, ряд $W^{(1)} \le ... \le W(M)$, где $M = n(n + 1)/2$.

3. Границы доверительного интервала $1 - \alpha$ будут равны:

$$d_L = W^{(C_\alpha)};\ d_U = W^{(M+1-C_\alpha)}. \qquad (18)$$

Тогда для всех d получаем:

$$P_d\{d_L < d < d_U\} = 1 - \alpha. \qquad (19)$$

Для больших выборок C_α можно рассчитать с помощью аппроксимации стандартным нормальным распределением:

$$C_\alpha \approx \frac{n(n+1)}{4} - z_{\alpha/2}\left[\frac{n(n+1)(2n+1)}{24}\right]^{1/2}. \qquad (20)$$

Это значение следует округлить до целого.

Пример 15. Возьмем данные примеров 11 и 12 и определим 95 % доверительный интервал. Рассчитаем $C_\alpha = n(n + 1)/2 + 1 - t_{\alpha/2,n} = 7(7 + 1)/2 + 1 - t_{0,023,7} = 29 - 26 = 3$.

Из примера 8 имеем упорядоченный ряд $W^{(1)} \le ... \le W^{(28)}$: –5,0; –4,5; –4,5; –4,0; –4,0; –3,5; –3,5; –3,0; –3,0; –3,0 –3,0; –2,5; –2,5; –2,5; –2,0; –2,0; –2,0; –2,0; –2,0; –2,0; –1,5; –1,5; –1,5; –1,0; –1,0; –0,5; –0,5; 0,0; 1,0.

Следовательно, из уравнений (18) имеем $d_L = W(3) = -4{,}5$; $d_U = W^{(26)} = -0{,}5$.

Таким образом, уменьшение изучаемого признака под влиянием препарата с вероятностью 0,954 находится в интервале от –4,5 мв до –0,5 мв.

Для сравнения зависимых выборок признака, измеренного в порядковой или количественной шкале, может быть также использован критерий знаков. Однако этот метод, по сравнению с критерием знаковых рангов Вилкоксона, обладает значительно меньшей мощностью [3, 6].

Предположим, что у нас есть 2 равновеликие выборки случайных величин X и Y, являющихся одной

и той же характеристикой изучаемых объектов до и после «обработки». Признак измерен в порядковой или количественной шкале. В последнем случае выборки имеют распределение отличное от нормального и логнормального.

Тогда $Z_i = Y_i - X_i = d + e_i$, $i = 1, ..., n$,
где: d — неизвестный сдвиг, вызываемый «обработкой»; e_i — ненаблюдаемые взаимно независимые случайные величины, принадлежащие непрерывной совокупности, имеющей медиану 0, так что:

$P(e_i < 0) = P(e_i > 0) = 0{,}5$, $i = 1, ..., n$

H_0: $d = 0$.

Чтобы проверить гипотезу, подсчитаем статистику M, которая равна количеству положительных Z_i, $i = 1, ..., n$. Если среди Z_i, $i = 1, ..., n$ есть нули, их необходимо отбросить, соответственно, уменьшив n до числа не нулевых значений.

H_0 против односторонней H_1 $d > 0$ на уровне значимости α отклоняют, если $M \geq m_{\alpha,n,1/2}$, где константа $m_{\alpha,n,1/2}$ — верхняя α-процентная точка биномиального распределения при объёме выборки n и $p = 0{,}5$, в противном случае нулевую гипотезу принимают.

H_0 против односторонней H_1 $d < 0$ на уровне значимости α отклоняют, если $M \leq (n - m_{\alpha,n,1/2})$, в противном случае нулевую гипотезу принимают.

H_0 против двухсторонней H_1 $d \neq 0$ на уровне значимости α отклоняют, если $M \geq m_{\alpha,n,1/2}$ или $M \leq (n - m_{\alpha,n,1/2})$ $\alpha = \alpha 1 + \alpha 2$, $m_{\alpha,n,1/2}$ находим из таблицы биномиального распределения [3, 7].

Пример 16. Возьмем данные примера 12. H_0 $d = 0$; H_1 $d < 0$, уровень значимости $\alpha = 0{,}05$, критерий односторонний. Так как $Z_4 = 0$, то $n = 7$. Только $Z_7 > 0$, следовательно, $M = 1$. Из таблицы получаем, что $m_{0{,}0625,7,1/2} = 6$, тогда $M = 1 = n - m_{0{,}0625,7,1/2} = 7 - 6$. Таким образом, H_0 можно отвергнуть только на уровне значимости $\alpha = 0{,}0625$. Так как исходно уровень значимости был принят 0,05, H_0 следует принять.

Пример 17. Возьмем данные из примера 13. H_0 $d = 0$; H_1 $d < 0$, уровень значимости $\alpha = 0{,}05$, критерий односторонний. Видно, что только $Z_5 > 0$, следовательно, $M = 1$. Из таблицы получаем, что $m_{0{,}0625,7,1/2} = 6$, тогда $M = 1 = n - m_{0{,}0625,7,1/2} = 7 - 6 = 1$. Таким образом, H_0 можно отвергнуть только на уровне значимости $\alpha = 0{,}0625$. Так как исходно уровень значимости был принят 0,05, H_0 следует принять. Из обоих примеров хорошо видно, что критерий знаков обладает значительно меньшей мощностью, чем критерий знаковых рангов Вилкоксона.

Также как для предыдущего метода, для критерия знаков в случае регистрации признака в количественных шкалах существует связанная с ним оценка d. Вычислить её достаточно просто. Необходимо упорядочить разности Z_i ($i = 1, ..., n$) по возрастанию и обозначить их так: $Z^{(1)} \leq ... \leq Z^{(n)}$. Оценка d, связанная со статистикой знаков, равна:

$$\hat{d} = Me\{Z_i,\ 1 \leq i \leq n\}. \qquad (21)$$

Медиану определяют, как описано выше.

Для сдвига d, вызванного обработкой, можно вычислить доверительный интервал, основанный на критерии знаков [3].

Для построения симметричного двухстороннего интервала для d, с коэффициентом доверия $1 - \alpha$, надо выполнить следующие действия:

1. Найти целое число

$$C_\alpha = n + 1 - m_{\alpha/2,n,1/2}, \qquad (22)$$

тогда

$$P_0\{C_\alpha \leq B \leq (n - C_\alpha)\} = 1 - \alpha. \qquad (23)$$

2. Используя упорядоченный по возрастанию ряд выборочных разностей $Z^{(1)} \leq ... \leq Z^{(n)}$(см. предыдущий метод), найти

$$d_L = Z(C_\alpha) \text{ и } d_U = Z(n + 1 - C_\alpha), \qquad (24)$$

Числа d_L и d_U таковы, что

$$P_0(d_L < d < d_U) = 1 - \alpha. \qquad (25)$$

Следует отметить, что при использовании критерия знаков фактически происходит переход от порядковой или количественной шкалы к номинальной (дихотомической) шкале.

Одним из самых мощных непараметрических методов для сравнения двух зависимых выборок, измеренных в истинно количественных шкалах, является **критерий рандомизации** [6]. Однако он очень трудоёмок, в связи с этим его применяют только при анализе малых выборок ($5 \leq n \leq 12$ при одностороннем уровне значимости $\alpha = 0{,}05$).

Предположим, что у нас есть 2 равновеликие выборки случайных величин X и Y, являющихся одной и той же характеристикой изучаемых объектов до и после «обработки», имеющих распределение отличное от нормального, измеренных в истинно количественной шкале.

Нулевой гипотезой является предположение о том, что сдвиг $d = 0$, т. е. «обработка» не оказывает влияния на изучаемые объекты.

Процедура метода состоит в следующих действиях:

1. Вычитание результата первого измерения каждой однородной пары из соответствующего результата второго измерения ($Z_i = Y_i - X_i$, $i = 1, ..., n$);

2. Подсчёт алгебраической суммы найденных разностей;

3. Определение общего количества возможных исходов (J), которое равно $2n$;

4. Перечисление всех исходов (G), которые приводят к получению результата, столь же или менее вероятного, чем наблюдаемый;

5. Расчёт суммарной односторонней вероятности столь же и менее вероятных исходов. Двухстороннюю вероятность можно получить путём удвоения односторонней.

Пример 18. На 6 крысах изучали влияние вещества А на частоту сокращений сердца. Данные представлены в таблице 11.

Таблица 11

Влияние вещества А на частоту сокращений сердца крыс

Table 11

The effect of compound A on heart rate of rats

№	Частота сокращений сердца, уд./мин		Изменение (сдвиг) Z_i, i = 1, ..., 6
	До введения веществ	После введения вещества	
1	320	350	30
2	360	370	10
3	355	325	–30
4	310	350	40
5	365	400	35
6	400	445	45

H_0: d = 0, вещество не влияет на частоту сокращений сердца.

H_1: d > 0, вещество увеличивает частоту сокращений сердца.

Критерий односторонний, уровень значимости $\alpha = 0{,}05$.

Так как распределение выборок отличается от нормального, а признак измерен в количественной шкале, то может быть применён критерий рандомизации.

Определим общее количество возможных исходов: $J = 2^6 = 64$.

Находим $\Sigma Z_i = 30 + 10 - 30 + 40 + 35 + 45 = 130$.

Перечислим все столь же или менее вероятные исходы (приводящие к сумме равной наблюдаемой или большей её):

30 + 10 – 30 + 40 + 35 + 45 = 130;

–30 + 10 + 30 + 40 + 35 + 45 = 130;

30 – 10 + 30 + 40 + 35 + 45 = 170;

30 + 10 + 30 + 40 + 35 + 45 = 190.

Таких исходов оказалось: $G = 4$.

Рассчитаем одностороннюю вероятность:

$$P_{\Sigma Z_i \geq 130} = \frac{G}{J} = \frac{4}{64} = 0{,}0625.$$

Таким образом, на принятом уровне значимости H_0 отвергнуть нельзя.

Перебор различных исходов может оказаться достаточно трудоёмким процессом, особенно когда H_0 верна. Для экономии времени и сил можно определить пороговое значение, после достижения которого перебор вариантов можно прекратить и принять H_0. Пороговое значение рассчитывается следующим образом: общее количество возможных исходов $J = 2n$ умножается на уровень значимости α и, в случае односторонней гипотезы, округляется до целого число с избытком. В случае двухсторонней гипотезы, полученное в результате умножения $(J \cdot \alpha)$ число делится на 2 и затем округляется. Например, если $n = 9$ и $\alpha = 0{,}05$, то $J = 2^9 = 512$, тогда при односторонней гипотезе пороговое значение равно $512 \cdot 0{,}05 = 25{,}6 \approx 26$.

Сравнение одной выборки с известным математическим ожиданием генеральной совокупности

При проведении исследований иногда возникает необходимость сравнения, полученных результатов с референтными значениями. Сразу отметим, что референтных значений для показателей, измеряемых в порядковых шкалах, не существует, так как эти оценки крайне операторозависимы. Однако при измерении количественных показателей, распределение которых отличается от нормального и логнормального, сравнение с референтными значениями может быть проведено. В частности, такая задача возникает в токсикологии при оценке влияния веществ на биохимические и токсикологические показатели.

Одним из непараметрических критериев для решения вышеуказанной задачи является **метод, основанный на статистике знаковых рангов** [3].

Предположим, что у нас есть выборка n наблюдений $Z_1, ..., Z_n$. Все Z взаимно независимы, измерены по количественной шкале, извлечены из симметричной относительно θ совокупности, где θ – неизвестное число.

Проверяем гипотезу H_0: $\theta = \theta_0$ или $\theta - \theta_0 = 0$, где θ_0 некоторое референтное значение, являющееся оценкой генеральной совокупности.

Для проверки нулевой гипотезы модифицируем полученные наблюдения следующим образом: $Z'_j = Z_i - \theta_0, j = i = 1, ..., n$. Если среди Z'_j встречаются нулевые значения, то их отбрасываем и объём выборки соответственно уменьшаем. Затем сортируем $|Z'_j|$ по возрастанию и присваиваем им соответствующие ранги. Ранги положительных вариант Z'_j суммируем: $T^+ = \sum r_i^+$.

T^+ сравниваем с критическим значениям $t_{\alpha,n}$ при соответствующем n и уровне значимости α, которые приведены в таблице распределения статистики знаковых рангов Вилкоксона [3, 7, 14]. H_0 отвергаем в пользу односторонней H_1 $\theta - \theta_0 > 0$, если $T^+ \geq t_{\alpha,n}$; односторонней H_1 $\theta - \theta_0 < 0$, если $T^+ \leq n(n+1)/2 - t_{\alpha,n}$, двухсторонней H_1 $\theta - \theta_0 \neq 0$, если $T^+ \geq t_{\alpha,n}$ или $T^+ \leq n(n+1)/2 - t_{\alpha,n}$ $\alpha = \alpha 1 + \alpha 2$, в противных случаях принимаем H_0.

Этот критерий можно применять при $n \geq 4$ (после исключения нулевых значений). В том случае, если $n \geq 20$ можно применить приближение для больших выборок.

Наиболее точной является аппроксимация предложенная [15]. Согласно этому приближению H0 отклоняется на уровне значимости α, если $|J| \geq J(\alpha)$ или $|J| \geq J(\alpha/2)$ при односторонней и двухсторонней гипотезах, соответственно, где:

$$J = \frac{T^*}{2}\left[1 + \left(\frac{n-1}{n-(T^*)^2}\right)^{1/2}\right], \quad J(\alpha) = \frac{z_\alpha}{2} + \frac{t_\alpha(f)}{2}, \quad (26)$$

где: z_α – (1–α)-квантиль стандартного нормального распределения; $t_\alpha(f)$ – α-квантиль распределения Стьюдента с $f = n - 1$ степенями свободы;

$$T^* = \frac{T^+ - \frac{n(n+1)}{4}}{\sqrt{\frac{n(n+1)(2n+1) - 0{,}5\sum_{i=1}^{g} t_i(t_i-1)(t_i+1)}{24}}}, \quad (27)$$

где: g — общее число групп совпадающих вариант; t_i — число совпавших величин в i-й группе. Если совпадающих вариант нет, выражение под знаком Σ равно 0.

Для того, чтобы рассчитать точечное значение θ или его доверительный интервал, методы, предложенные при рассмотрении критерия знаковых рангов Вилкоксона (см. выше), следует применить к первоначальным вариантам Z_i, $i = 1, ..., n$.

Таблица 12

Влияние вещества X на содержание гемоглобина в крови по отношению к референтному значению

Table 12

Effect of substance X on the content of hemoglobin in the blood in relation to the reference value

№	Содержание гемоглобина в крови женщин (Hb), г/л	$Hb - Hb_0$	Ранг
1	113,0	–2	1,5
2	115,0	0	–
3	117,0	2	1,5
4	112,0	–3	3
5	110,0	–5	4,5
6	115,0	0	–
7	110,0	–5	4,5
8	109,0	–6	6
9	105,0	–10	7
10	100,0	–15	8

Пример 19. У 10 женщин, перенёсших сильное отравление неизвестным веществом, измеряли уровень гемоглобина в крови. Необходимо было выяснить, снижает ли это вещество уровень гемоглобина по сравнению с минимальным референтным значением ($Hb_0 = \theta_0$), которое равно 115,0 г/л. Данные представлены в таблице 12.

H_0: $\theta = \theta_0 = 115{,}0$.

H_1: $\theta < \theta_0$

Уровень значимости: $\alpha = 0{,}05$.

Так как в 2 случаях $Hb - Hb_0 = 0$, то n уменьшается до 8. $T^+ = 1{,}5 < n(n+1)/2 - t_{0{,}012{,}8} = 36 - 34 = 2$.

Таким образом, H_0 может быть отвергнута на уровне значимости $p = 0{,}012$ в пользу односторонней H_1: $\theta < \theta_0 = 115{,}0$. Следовательно, отравление данным веществом уменьшает содержание гемоглобина в крови ниже минимального референтного уровня.

Рассчитаем точечную оценку θ. С этой целью создадим ряд величин $(Hb_i + Hb_j)/2$, где $i \le j$, ..., M, $M = n(n+1)/2$. Упорядочим этот ряд по возрастанию, т.е. получим $W^{(1)} \le ... \le W^{(55)}$: 100,0; 102,5; 104,5; 105,0; 105,0; 105,0; 106,0; 106,5; 107,0; 107,5; 107,5; 107,5; 107,5; 107,5; 108,5; 108,5; 109,0; 109,0; 109,5; 109,5; 110,0; 110,0; 110,0; 110,0; 110,0; 110,5; 111,0; 111,0; 111,0; 111,0; 111,5; 111,5; 112,0; 112,0; 112,0; 112,5; 112,5; 112,5; 112,5; 112,5; 113,0; 113,0; 113,5; 113,5; 113,5; 113,5; 114,0; 114,0; 114,5; 115,0; 115,0; 115,0; 115,0; 116,0; 116,0; 117,0.

$$\hat{\theta} = W^{(28)} = 111{,}0 \text{ г/л}.$$

Используя таблицу распределения статистики знаковых рангов Вилкоксона [3, 7, 14], определим доверительный интервал для θ. Рассчитаем $C_\alpha = C_{0{,}042} = n(n+1)/2 + 1 - t_{0{,}042{,}10} = 10 \cdot 11/2 + 1 - 45 = 11$. Тогда $\theta L = W^{(11)} = 107{,}5$; $\theta_U = W^{(M+1-C\alpha)} = W^{(45)} = 113{,}5$.

Таким образом, 91,6 % доверительный интервал $\theta_L \div \theta_U = 107{,}5 \div 113{,}5$.

Одним из используемых в таких случаях методов является **критерий рандомизации** [6], который может быть применён только для анализа признаков, измеряемых в истинно количественных шкалах. При этом следует отметить, что объём выборки должен быть небольшим, в противном случае метод становится чрезвычайно трудоёмким. Суть метода заключается в следующем: определяют алгебраическую сумму разностей вариант выборки и референтного значения; с помощью перебора находят количество (G) исходов столь же или менее вероятных, чем наблюдаемый исход. Определяют общее количество возможных исходов (J), которое равно $2N$. Рассчитывают суммарную одностороннюю вероятность столь же или менее вероятных исходов $\left(P = \frac{G}{J}\right)$. Двухстороннюю вероятность получают удвоением односторонней.

Пример 20. У крыс линии SHR систолическое АД составляет в среднем 190 мм рт. ст. У 6 крыс были зарегистрированы следующие уровни систолического АД: 180, 181, 185, 188, 189, 193 мм рт. ст. Необходимо проверить нулевую гипотезу о том, что эта выборка извлечена из генеральной совокупности вышеупомянутой линии крыс.

H_0: $\mu = \mu_0$.

H_1: $\mu \ne \mu_0$.

Критерий двухсторонний. Уровень значимости: $\alpha = 0{,}05$.

Первым шагом анализа является нахождение разностей между измеренными уровнями АД и математическим ожиданием генеральной совокупности. Эти разностные отметки X_i ($i = 1, ..., 6$) равны: –10, –9, –5, –2, –1, +3.

Затем находим сумму разностей: –10 –9 –5 –2 –1 + 3 = –24.

Находим общее количество возможных исходов, которое равно $J = 2^N = 64$.

Перечисляем всевозможные исходы, которые приводят к получению суммы, равной наблюдаемой или меньшей её (исходы получают за счёт изменения знаков у слагаемых):

−10 −9 −5 −2 −1 +3 = −24
−10 −9 −5 +2 −1 −3 = −26
−10 −9 −5 −2 +1 −3 = −28
−10 −9 −5 −2 −1 −3 = −30
−10 −9 −5 +2 +1 −3 = −24.

Таких исходов оказалось: $G = 5$. Рассчитываем вероятность получения исхода столь же или ещё более редкого, чем наблюдаемый. С этой целью количество найденных маловероятных исходов делим на количество возможных исходов:

$$P_{\Sigma X \le -24} = G/J = 5/64 = 0{,}078.$$

Это одностороннее значение p – вероятность того, что сумма будет равна или меньше −24. Для получения двухстороннего значения p (вероятности того, что сумма будет меньше или равна −24, либо больше или равна 24) необходимо удвоить полученное значение:

$$P_{\Sigma X \le -24 \text{ или } \ge 24} = 10/64 = 0{,}156.$$

Таким образом, мы принимаем нулевую гипотезу о том, что выборка извлечена из генеральной совокупности с $\mu_0 = 190$.

Рассмотренный критерий является одним из наиболее мощных, однако с увеличением размера выборки он становится чрезвычайно трудоёмким. Особенно утомителен этот критерий, когда H_0 верна, так как в этом случае количество комбинаций, которые по крайней мере столь же маловероятны, как и наблюдаемый результат, велико. Для того, чтобы минимизировать процесс анализа, рассчитывают максимальное число исходов, которое позволяет отклонить H_0. Это пороговое значение для одностороннего критерия равно $\alpha \cdot 2^N$. Например, если критерий односторонний с уровнем значимости $\alpha = 0{,}05$ и $N = 10$, то такое пороговое число исходов равно $0{,}05 \cdot 2^{10} = 0{,}05 \cdot 1024 = 51{,}2$. При двухстороннем критерии полученный результат необходимо разделить на 2. Как только пороговое значение будет достигнуто, можно прекратить перебор вариантов и принять нулевую гипотезу.

Методы сравнения нескольких выборок (k>2) порядковых данных

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

Рассмотрим пример. Исследовали влияние соединений А и В на тяжесть аритмий, вызываемых 7-минутной окклюзией и последующей реперфузией коронарной артерии. Тяжесть нарушений ритма оценивали в баллах. Эксперимент проводили на 3 группах крыс: I за 2 минуты до окклюзии коронарной артерии вводили вещество А; II — вещество Б; III — эквивалентный объём растворителя. Статистическая обработка с помощью критерия Вилкоксона-Манна-Уитни показала, что в каждом из трёх сравнений $p < 0{,}05$, т. е. вероятность ошибки I рода менее 5 %. Однако это не совсем так. В действительности, так как мы допускаем 5 % процентную ошибку в каждом из сравнений, вероятность ошибки будет значительно больше. В общем случае эта вероятность равна: $P' = 1 - (1 - p)k$, где k — количество сравнений, p — принятый нами критический уровень значимости. При небольшом количестве сравнений $P' \approx pk$. Следовательно, в нашем случае вероятность ошибиться хотя бы в 1 из сравнений составляет не многим менее 15 % [5].

При проведении статистического анализа нескольких выборок, измеренных с помощью количественных шкал, обычно используют дисперсионный анализ с последующей обработкой каким-либо критерием множественных сравнений. Однако этот метод имеет определённые ограничения: данные должны иметь нормальное или близкое к нему распределение (некоторые отклонения от нормальности не являются критическими), дисперсии выборок должны быть гомогенны. Если указанные допущения не выполняются или показатель измерен с помощью порядковой шкалы, используют непараметрические аналоги дисперсионного анализа.

Однофакторный непараметрический анализ по Краскелу–Уоллису

Аналогом однофакторного дисперсионного анализа является свободный от распределения критерий Краскела–Уоллиса, представляющий собой обобщение критерия Вилкоксона–Манна–Уитни [2, 3, 6]. При анализе полученных данных этим критерием проверяют нулевую гипотезу о том, что эффекты нескольких выборок, содержащих по $n_1, n_2, \ldots, nm$ ($m \ge 3$) вариант в каждой, равны против альтернативы о том, что не все обработки обладают одинаковым действием. При этом предполагается, что все случайные ошибки независимы и извлечены из одной непрерывной совокупности.

Алгоритм обработки данных с помощью критерия Краскела–Уоллиса выглядит следующим образом:

1. Объединить все выборки и проранжировать все $N = \sum_{j=1}^{m} n_j$ наблюдений от меньшего к большему. Пусть r_{ij} обозначает ранг варианты X_{ij} в этой совместной ранжировке ($i = 1, 2, \ldots, n_j$, $j = 1, 2, \ldots, m$).

2. Определить $R_j = \sum_{i=1}^{n_j} r_{ij}$, $R_{\bullet j} = \frac{R_j}{n_j}$, $R_{\bullet\bullet} = \frac{N+1}{2}$,

т. е. R_j — сумма рангов j-й обработки; $R_{\infty j}$ — средний ранг этой обработки; $R_{\infty\alpha}$ — средний ранг объединённой группы.

3. Вычислить показатель критерия Краскела–Уоллиса

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^{m} n_j (R_{\bullet j} - R_{\bullet\bullet})^2 = \\ = \left(\frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^{m} \frac{R_j^2}{n_j} \right) - 3(N+1). \quad (28)$$

4. На критическом уровне значимости α:

отклонить H_0, если рассчитанный показатель $H \geq h_{(m,(n_1,n_2,\ldots,n_m),\alpha)}$;

принять H_0, если рассчитанный показатель $H < h_{(m,(n_1,n_2,\ldots,n_m),\alpha)}$;

где постоянная $h_{(m,(n_1,n_2,\ldots,n_m),\alpha)}$ удовлетворяет уравнению $P_0\{H \geq h_{(m,(n_1,n_2,\ldots,n_m),\alpha)}\} = \alpha$.

Однако достаточно полные таблицы критических значений критерия Краскела–Уоллиса очень громоздки и труднодоступны [3, 7], в связи с этим были разработаны различные аппроксимации этого критерия, которые применимы при $n_i \geq 5$. Мы приведём одну из них, разработанную [16]. В соответствии с этой аппроксимацией нулевая гипотеза равенства эффектов обработок отклоняется на уровне значимости α, если $J \geq J_\alpha$

$$J = \frac{H}{2}\left(1 + \frac{N-m}{N-1-H}\right); \\ J_\alpha = \frac{1}{2}\left[(m-1)F_{m-1;N-m;\alpha} + \chi^2_{m-1;\alpha}\right], \quad (29)$$

где: $F_{m-1;N-m;\alpha}$ и $\chi^2_{m-1;\alpha}$ — соответственно, критические значения распределения Фишера–Снедекора и хи-квадрат с соответствующими степенями свободы.

При минимальном $n_i \geq 20$ статистика H достаточно хорошо аппроксимируется распределением хи-квадрат с $m-1$ степенями свободы.

Достаточно часто при проведении ранжирования величины вариант совпадают, в этом случае вариантам (наблюдениям) следует присваивать средние ранги. При этом статистику H следует заменить на H′, где:

$$H' = \frac{H}{1 - \left(\sum_{j=1}^{g} \frac{T_j}{[N^3 - N]} \right)}, \quad (30)$$

При этом g — число групп равных вариант, $T_j = t_j^3 - t_j$; t_j — объём группы равных наблюдений с номером j. Одиночные варианты рассматриваются как группы объёма 1. Таким образом, если равные наблюдения отсутствуют, то $g = N$, $t_j = 1$, $T_j = 0$ при всех $j = 1, \ldots, N$, тогда H′ = H (*Статистику H′ рассчитывают в том случае, если совпадающие величины принадлежат разным выборкам*).

Результаты представляют в виде медиан и нижнего, и верхнего квартилей. Указывают также показатель Краскела–Уоллиса (H) и ошибку I рода (p).

Пример 21. На беспородных мышах через 2 часа после отмены этанола при его положительном потреблении изучали влияние 2 новых веществ на судороги, вызываемые вертикальным подъёмом животных за хвост и вращением на 180° («хендлингом»). Выраженность судорог оценивали с помощью порядковой шкалы (табл. 13) [10]. Исследование проводили на 3 группах по 6 животных в каждой: 1-я – контроль; 2-я — вещество А; 3-я — вещество Б (табл. 14).

Таблица *13*

Шкала оценки судорожных реакций, вызванных «хендлингом»

Table 13

The scale of evaluation of convulsive reactions caused by "handling"

Баллы	Характеристика поведения
0	Отсутствие судорог
1	Отсутствие судорог при подъёме за хвост
2	Отсутствие судорог при подъёме за хвост; тонические судороги после вращения на 180°
3	Судороги при подъёме за хвост и после вращения на 180°
4	Тонические судороги при подъёме за хвост
5	Тонико-клонические судороги при подъёме за хвост; запаздывание на 1-2 с
6	Сильные тонико-клонические судороги при подъёме за хвост с быстрым наступлением и длительной продолжительностью
7	Сильные тонико-клонические судороги до поднятия за хвост с быстрым наступлением и большой длительности

Таблица 14

Влияние веществ А и Б на судорожные реакции, вызваемые «хендлингом» в условиях абстиненции после отмены этанола

Table 14

Effect of substances A and B on convulsive reactions caused by "handling" in withdrawal conditions after ethanol withdrawal

Контроль		Вещество А		Вещество Б	
Баллы	Ранг	Баллы	Ранг	Баллы	Ранг
7	17,5	0	1,5	3	5,5
6	15	1	3	4	8,5
6	15	0	1,5	4	8,5
7	17,5	2	4	5	12
5	12	3	5,5	5	12
4	8,5	4	8,5	6	15

H_0: Эффекты обработок равны (выборки принадлежат к одной генеральной совокупности).

H_1: Эффекты обработок различаются (выборки принадлежат, по крайней мере, к 2 генеральным совокупностям)

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

Объединим выборки, отсортируем наблюдения ($N = 18$) по возрастанию и присвоим ранги каждой варианте:

0; 0; 1; 2; 3; 3; 4; 4; 4; 4; 5; 5; 5; 6; 6; 6; 7;7

Рассчитаем необходимые промежуточные показатели:

$R_1 = 8,5 + 12 + 15 + 15 + 17,5 + 17,5 = 85,5$; $R_{\cdot 1} = 14,25$; $R_2 = 1,5 + 1,5 + 3 + 4 + 5,5 + 8,5 = 24$; $R_{\cdot 2} = 4$; $R_3 = 5,5 + 8,5 + 8,5 + 12 + 12 + 15 = 61,5$; $R_{\cdot 3} = 10,25$; $R_{\cdot\cdot} = 9,5$.

Рассчитаем статистику Краскела–Уоллиса (28):

$$H = \frac{12}{N(N+1)}\sum_{j=1}^{m} n_j (R_{\cdot j} - R_{\cdot\cdot})^2 =$$

$$\frac{12}{18(18+1)}(6(14,25-9,5)^2 + 6(4-9,5)^2 +$$

$$+7(10,25-9,5)^2) = 11,86.$$

Так как в полученных результатах имеется несколько групп равных (связанных) наблюдений, то следует рассчитать показатель (30):

$$H' = \frac{H}{1 - \left(\sum_{j=1}^{g} \frac{T_j}{[N^3 - N]}\right)} =$$

$$= \frac{11,86}{1 - \frac{(4^3-4)+(3^3-3)+(3^3-3)+(2^3-2)}{18^3-18}} =$$

$$= \frac{11,86}{1-0,02} = 12,10.$$

Согласно таблице распределения статистики Краскела–Уоллиса, получаем, что $H' = 12,10 > H_{3;\,(6,6,6);0,001} = 10,889$. Следовательно, мы отвергаем гипотезу H_0 и принимаем альтернативную гипотезу H_1 на уровне статистической значимости $p < 0,001$.

Пример 22. На крысах с развившейся алкогольной зависимостью в приподнятом крестообразном лабиринте изучали влияние триметазидина на количество заходов в светлый отсек. Опыты были проведены на 3 группах животных:

1-я — интактные крысы ($n = 8$);

2-я — алкоголизированные контрольные животные ($n = 7$);

3-я — алкоголизированные крысы, получавшие триметазидин ($n = 7$).

Данные представлены в таблице 15.

Таблица 15

Влияние триметазидина на количество заходов в светлый отсек приподнятого крестообразного лабиринта

Table 15

Effect of trimetazidine on the number of visits to the light compartment of the raised cruciform labyrinth

Интактные крысы		Контрольные алкоголизованные крысы		Крысы, получавшие триметазидин	
Количество заходов	Ранг	Количество заходов	Ранг	Количество заходов	Ранг
1	8,5	0	3	2	13,5
1	8,5	0	3	3	17
0	3	2	13,5	2	13,5
1	8,5	0	3	5	20,5
5	20,5	1	8,5	4	19
2	13,5	1	8,5	7	22
1	8,5	0	3	3	17
3	17				

H_0: Эффекты обработок равны (выборки принадлежат к одной генеральной совокупности).

H_1: Эффекты обработок различаются (выборки принадлежат, по крайней мере, к 2 генеральным совокупностям).

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

Рассчитаем необходимые промежуточные показатели: $R_1 = 3 + 4 \cdot 8,5 + 13,5 + 17+20,5 = 88$; $R_{\cdot 1} = 11$; $R_2 = 4 \cdot 3 + 8,5 \cdot 2 + 13,5 = 42,5$; $R_{\cdot 2} = 6,07$; $R_3 = 2 \cdot 13,5 + 2 \cdot 17 + 19 + 20,5 + 22 = 122,5$; $R_{\cdot 3} = 17,5$; $R_{\cdot\cdot} = 11,5$.

Рассчитаем статистику Краскела–Уоллиса (28):

$$H = \frac{12}{N(N+1)}\sum_{j=1}^{m} n_j (R_{\cdot j} - R_{\cdot\cdot})^2 =$$

$$= \frac{12}{22(22+1)}(8(11-11,5)^2 + 7(6,07-11,5)^2 +$$

$$+7(17,5-11,5)^2) = 10,92.$$

Так как в полученных результатах имеется несколько групп равных (связанных) наблюдений, то следует рассчитать показатель (30):

$$H' = \frac{H}{1 - \left(\sum_{j=1}^{g} \frac{T_j}{[N^3 - N]}\right)} =$$

$$= \frac{10,92}{1 - \frac{(6^3-6)+(5^3-5)+(4^3-4)+(3^3-3)+(2^3-2)}{22^3-22}} =$$

$$= \frac{10,92}{1-0,04} = 11,37.$$

Поскольку разбираемый случай отсутствует в доступной таблице критических значений критерия Краскела–Уоллиса, то мы воспользуемся аппроксимацией Имана–Давенпорта (29):

$$J = \frac{H'}{2}\left(1 + \frac{N-m}{N-1-H'}\right) =$$

$$= \frac{11{,}37}{2}\left(1 + \frac{22-3}{22-1-11{,}37}\right) = 16{,}90;$$

$$J_{0{,}05} = \frac{1}{2}[(m-1)F_{m-1;N-m;0{,}05} + \chi^2_{m-1;0{,}05}] =$$

$$= \frac{1}{2}[2F_{2;19;0{,}05} + \chi^2_{2;0{,}05}] = \frac{1}{2}[2 \cdot 3{,}52 + 5{,}99] = 6{,}52.$$

Так как $J > J_{0{,}05}$, то мы отвергаем нулевую гипотезу на уровне $p < 0{,}05$.

В большинстве случаев исследователя-фармаколога интересует вопрос о том, эффекты каких обработок различаются между собой, а какие нет. Для решения этого вопроса используются различные непараметрические критерии множественных сравнений.

Так как таблицы для различных наборов данных (n_1, ..., n_m) отсутствуют, да число таких возможных наборов чрезвычайно велико, ты мы разберем один консервативный метод, связанный со статистикой Краскела–Уоллиса, и несколько приближений, использующих статистики, так или иначе, связанные с нормальным распределением.

После того как с помощью однофакторного анализа по Краскелу–Уоллису нулевая гипотеза была отвергнута, для попарного сравнения независимых выборок, для которых можно найти критические значения критерия Краскела–Уоллиса $\left(h_{m,(n_1,n_2,\ldots,n_m),\alpha}\right)$, может быть использован следующий критерий: при вероятности ошибочного решения, не большей, чем α, принять решение о том, что нулевую гипотезу о равенстве эффектов двух обработок можно отвергнуть, если:

$$\left|R_{\bullet u} - R_{\bullet v}\right| \geq \{h_{m,(n_1,n_2,\ldots,n_m),\alpha}\}^{0{,}5} \times$$

$$\times\left[\frac{N(N+1)}{12}\right]^{0{,}5}\left(\frac{1}{n_u} + \frac{1}{n_v}\right)^{0{,}5}, \qquad (31)$$

где $R_{\bullet u}, R_{\bullet v}$ — средние ранги обработок, $h_{m,(n_1,n_2,\ldots,n_m),\alpha}$ критическое значение критерия Краскела–Уоллиса, которое можно найти в соответствующей таблице критических значений множественных сравнений, основанных на ранговых суммах Краскела–Уоллиса [3], N — общее количество вариант в комплексе, n_u, n_v — объёмы сравниваемых выборок, $u = 1, \ldots, m-1$, $v = 2, \ldots, m$; $u < v$.

При выборках равных объёмов может быть использован непараметрический вариант критерия множественных сравнений по Ньюмена–Кейлсу [5, 17]. Формула для этого критерия выглядит следующим образом:

$$q = \frac{R_v - R_u}{\sqrt{\frac{n^2 l(nl+1)}{12}}}, \qquad (32)$$

где R_u, R_v — суммы рангов двух сравниваемых выборок (выборки располагаются по нарастанию суммы рангов, $u = 1, \ldots, m-1 < v = u+1, \ldots, m$); n — объём каждой выборки; l — интервал сравнения (Интервал сравнения определяют следующим образом: при сравнении средних, стоящих на i-м и j-м месте в упорядоченном ряду, $l = j - i + 1$. Например, при сравнении 7-го и 2-го членов этого ряда $l = 7 - 2 + 1 = 6$); m — количество выборок. Вычисленное q сравнивают с критическим значением для бесконечного числа степеней свободы (таблица критических значений критерия Ньюмена–Кейлса [5]). Если рассчитанное $q \geq q_{\infty,\,l,\,\alpha}$, то нулевую гипотезу о равенстве двух эффектов обработок отвергают на уровне значимости α. Количество таких сравнений равно $m(m-1)/2$.

Сравнение сумм рангов проводят в определённом порядке: сначала сравнивают наибольшую (m-ю) сумму рангов с наименьшей (1-й), затем m-ю со 2-й и т. д. до m-1-й. Затем предпоследнее значение с 1-м, 2-м и т. д. Если какие-то выборки статистически значимо не различаются, то и все лежащие между ними также не различаются.

В том случае, когда необходимо сравнить контрольную выборку со всеми остальными, при равенстве их объёмов можно использовать непараметрический вариант критерия Даннета [5, 17]. Формула его выглядит следующим образом:

$$q' = \frac{|R_{contr} - R_i|}{\sqrt{\frac{n^2 l(n_1+1)}{6}}}, \qquad (33)$$

где R_{contr} — сумма рангов контрольной выборки; R_i — сумма рангов выборки, сравниваемой с контрольной; n — объём каждой выборки; l — число выборок. Вычисленное значение q' сравнивают с критическим значением для бесконечного числа степеней свободы (таблица критических значений критерия Даннета [5, 18]). Если рассчитанное $q' \geq q'_{\infty,\,l,\,\alpha}$, то нулевую гипотезу о равенстве двух эффектов обработок отвергают на уровне значимости α. Количество таких сравнений равно $m - 1$.

Для сравнения выборок как равного, так и разного объёма может быть использован критерий Данна [3, 19]. Этот критерий выглядит следующим образом: принять альтернативную гипотезу (эффекты 2 обработок различаются) на критическом уровне значимости α, следует в том случае, если:

$$| R_{\bullet u} - R_{\bullet v} | \geq z_{\alpha/[m(m-1)]} \sqrt{\frac{N(N+1)(n_u + n_v)}{12 n_u n_v}}, \quad (34)$$

где $R_{\bullet u}, R_{\bullet v}$ — средние ранги изучаемых выборок; $z_{\alpha/[m(m-1)]}$ — квантиль стандартного нормального распределения; m — количество сравниваемых выборок; N — общее количество вариант в комплексе; n_u, n_v — объёмы сравниваемых выборок, $u = 1, \ldots, m-1$, $v = 2, \ldots, m$; $u < v$.

Если необходимо провести сравнение обработок с контролем, то критерий Данна приобретает следующий вид: принять альтернативную гипотезу (эффект обработки U отличается от контроля) на критическом уровне значимости α в том случае, если:

$$| R_{\bullet u} - R_{\bullet contr} | \geq z_{\alpha/[2(m-1)]} \sqrt{\frac{N(N+1)(n_u + n_{contr})}{12 n_u n_{contr}}}$$

(двухсторонняя гипотеза), (35)

$$| R_{\bullet u} - R_{\bullet contr} | \geq z_{\alpha/(m-1)} * \sqrt{\frac{N(N+1)(n_u + n_{contr})}{12 n_u n_{contr}}}$$

(односторонняя гипотеза), (36)

где: $R_{\bullet contr}$ — средний ранг контрольной выборки; n_{contr} — объём контрольной выборки.

Пример 23. Используем данные, представленные в примере 22.

H_0: эффекты любых 2 обработок равны.

H_1: эффекты некоторых обработок различаются между собой.

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

Так как выборки имеют различный объём, то используем критерий множественных сравнений Данна (34): $z_{\alpha/[m(m-1)]} = z_{0{,}05/6} = 2{,}394$;

$$| R_{\bullet 1} - R_{\bullet 2} | = | 11 - 6{,}07 | =$$

$$= 4{,}93 < 2{,}394 \sqrt{\frac{22 \cdot 23 \cdot (8+7)}{12 \cdot 8 \cdot 7}} = 8{,}05;$$

$$| R_{\bullet 1} - R_{\bullet 3} | = | 11 - 17{,}5 | =$$

$$= 6{,}5 < 2{,}394 \sqrt{\frac{22 \cdot 23 \cdot (8+7)}{12 \cdot 8 \cdot 7}} = 8{,}05;$$

$$| R_{\bullet 2} - R_{\bullet 3} | = | 6{,}07 - 17{,}5 | =$$

$$11{,}43 > 2{,}394 \sqrt{\frac{22 \cdot 23 \cdot (7+7)}{12 \cdot 7 \cdot 7}} = 8{,}31.$$

Таким образом, статистически значимо ($p < 0{,}05$) различаются 2 и 3 обработки.

Теперь проведём анализ данных, приняв вторую выборку (контрольные алкоголизированные крысы) как контрольную и применив одностороннюю гипотезу (36): $z_{\alpha/(m-1)} = z_{0{,}05/2} = 1{,}96$;

$$| R_{\bullet 1} - R_{\bullet contr} | = | 11 - 6{,}07 | =$$

$$= 4{,}93 < 1{,}96 \sqrt{\frac{22 \cdot 23 \cdot (8+7)}{12 \cdot 8 \cdot 7}} = 6{,}59;$$

$$| R_{\bullet 3} - R_{\bullet contr} | = | 17{,}5 - 6{,}07 | =$$

$$= 11{,}43 > 1{,}96 \sqrt{\frac{22 \cdot 23 \cdot (7+7)}{12 \cdot 7 \cdot 7}} = 6{,}80.$$

Таким образом, препарат статистически значимо ($p < 0{,}05$) увеличивает количество заходов в светлый отсек крыс с развившейся алкогольной зависимостью.

Пример 24. Несколько изменим данные примера 22 так, чтобы выборки были одинакового объёма (табл. 16).

Таблица 16

Table 16

Интактные красы		Контрольные алкоголизованные крысы		Крысы, получавшие триметазидин	
Количество заходов	Ранг	Количество заходов	Ранг	Количество заходов	Ранг
1	8,5	0	3	2	13,5
1	8,5	0	3	3	17
0	3	2	13,5	2	13,5
1	8,5	0	3	5	20
2	13,5	1	8,5	4	19
1	8,5	1	8,5	7	21
3	17	0	3	3	17

H_0: эффекты любых 2 обработок равны.

H_1: эффекты некоторых обработок различаются между собой.

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

Так как выборки имеют равный объём, то может быть использован критерий множественных сравнений Ньюмена–Кейлса.

Рассчитаем необходимые промежуточные показатели: $R_1 = 3 + 4 \cdot 8{,}5 + 13{,}5 + 17 = 67{,}5$; $R_2 = 4 \cdot 3 + 8{,}5 \cdot 2 + 13{,}5 = 42{,}5$; $R_3 = 2 \cdot 13{,}5 + 2 \cdot 17 + 19 + 20 + 21 = 121$.

Расположим полученные суммы в порядке нарастания: $R_2 = 42{,}5$; $R_1 = 67{,}5$; $R_3 = 121$.

Проведем сравнения (32):

$$q_{3,2} = \frac{R_3 - R_2}{\sqrt{\frac{n^2 l(nl+1)}{12}}} = \frac{121 - 42{,}5}{\sqrt{\frac{7^2 \cdot 3(7 \cdot 3 + 1)}{12}}} =$$

$$= 4{,}78 > q_{\infty;3;0{,}05} = 3{,}314;$$

$$q_{3,1} = \frac{R_3 - R_1}{\sqrt{\frac{n^2 l(nl+1)}{12}}} = \frac{121 - 67{,}5}{\sqrt{\frac{7^2 \cdot 2(7 \cdot 2 + 1)}{12}}} =$$
$$= 4{,}83 > q_{\infty;2;0{,}05} = 2{,}772;$$

$$q_{1,2} = \frac{R_1 - R_2}{\sqrt{\frac{n^2 l(nl+1)}{12}}} = \frac{67{,}5 - 42{,}5}{\sqrt{\frac{7^2 \cdot 2(7 \cdot 2 + 1)}{12}}} =$$
$$= 2{,}26 < q_{\infty;2;0{,}05} = 2{,}772.$$

Таким образом, на уровне значимости $p < 0{,}05$ в 2 случаях из трёх следует отвергнуть нулевую гипотезу и принять H_1 о том, что эффекты обработок неравны. Следовательно, можно полагать, что изучаемый препарат увеличивает количество заходов в светлый отсек животных с алкогольной зависимостью по сравнению как с алкоголизированными, так и с интактными крысами.

Теперь проведём анализ данных, приняв вторую выборку (контрольные алкоголизированные крысы) как контрольную. Применив критерий Даннета (33), получаем:

$$q'_{contr,3} = \frac{|R_{contr} - R_3|}{\sqrt{\frac{n^2 l(nl+1)}{6}}} = \frac{|42{,}5 - 121|}{\sqrt{\frac{7^2 \cdot 3(3 \cdot 7 + 1)}{6}}} =$$
$$= 3{,}38 > q'_{\infty;3;0{,}05} = 2{,}21;$$

$$q'_{contr,1} = \frac{|R_{contr} - R_1|}{\sqrt{\frac{n^2 l(nl+1)}{6}}} = \frac{|42{,}5 - 67{,}5|}{\sqrt{\frac{7^2 \cdot 3(3 \cdot 7 + 1)}{6}}} =$$
$$= 1{,}08 < q'_{\infty;3;0{,}05} = 2{,}21.$$

Таким образом, для первой группы нулевую гипотезу следует принять, а для третьей – отвергнуть на уровне $p < 0{,}05$.

Непараметрический аналог дисперсионного анализа повторных измерений. Критерий Фридмана–Кендела–Бэбингтона Смита

При проведении фармакологических исследований часто приходится сравнивать физиологические показатели одного и того же животного в нескольких временных точках или при нескольких различных воздействиях, т. е. сравнивать зависимые выборки. В таких случаях при соблюдении необходимых условий (количественная шкала, нормальное распределение данных) обработку результатов экспериментов проводят с помощью дисперсионного анализа повторных измерений. Однако, если наблюдаются значительные отклонения от нормальности распределения или для оценки признака использована порядковая шкала, необходимо использовать критерий Фридмана–Кендэла–Бэбингтона Смита [3, 5, 17], являющийся непараметрическим аналогом дисперсионного анализа повторных измерений.

Предположим, что мы имеем n объектов, у каждого из которых в m временных точках измерен некий показатель в количественной или порядковой шкале. Все случайные ошибки взаимно независимы и извлечены из одной непрерывной совокупности. $\acute{\eta}_j$ — неизвестные эффекты обработки ($j = 1, ..., m$).

Для проверки H_0: $\acute{\eta}_1 = \acute{\eta}_2 = ... = \acute{\eta}_m$ против альтернативы о том, что не все $\acute{\eta}$ равны между собой сделаем следующее.

1. Проранжируем m измерений каждого объекта в порядке нарастания. Обозначим r_{ij} ранги X_{ij} совместно ранжировке $X_{i1}, ..., X_{im}$, где: $i = 1, ..., n$ номера изучаемых объектов, j – номера обработок.

2. Рассчитаем: $R_j = \sum_{i=1}^{n} r_{ij}$ — сумма рангов, приписанных j-й обработке; $R_{\bullet j} = \frac{R_j}{n}$ – средний ранг j-й обработки; $R_{\bullet\bullet} = \frac{m+1}{2}$.

3. Рассчитаем:

$$S = \frac{12n}{m(m+1)} \sum_{j=1}^{m} (R_{\bullet j} - R_{\bullet\bullet})^2 =$$
$$= \left[\frac{12}{nm(m+1)} \sum_{j=1}^{m} R_j^2 \right] - 3n(m+1). \qquad (37)$$

На уровне значимости α:
отклоним H_0, если $S \geq s_{m,n,\alpha}$;

примем H_0, если $S < s_{m,n,\alpha}$,

где: $s_{m,n,\alpha}$ удовлетворяет уравнению $P_0\{S \geq s_{m,n,\alpha}\} = \alpha$ (см. таблицу распределения статистики Фридмана [3, 5, 7]).

Если у объекта в разных точках встречаются одинаковые значения измерений, то им присваивается средний ранг. В этом случае S заменяется на S':

$$S' = \frac{12 \sum_{j=1}^{m} (R_j - nR_{\bullet\bullet})^2}{nm(m+1) - [1/(m-1)] \sum_{i=1}^{n} \left\{ \left(\sum_{j=1}^{g_i} t_{i,j}^3 \right) - m \right\}}, \qquad (38)$$

где: g_i — число групп равных (связанных) измерений у объекта i; $t_{i,j}$ — объём j-й связанной группы объекта i; наблюдения неравные другому для этого объекта рассматриваются как группы объёмом 1. Если вообще нет связанных вариант, то S' сводится к S.

Так как таблицы распределения статистики Фридмана составлены для относительно небольшого диапа-

зона значений m, n, то широко применяют различные аппроксимации.

При $n \geq 13$ и $m \geq 20$ статистика Фридмана хорошо аппроксимируется распределением χ^2 с числом степеней свободы $m - 1$. В этом случае H_0 отвергают на критическом уровне значимости α и принимают H_1 в том случае, если $S \geq \chi^2_{m-1,\alpha}$.

Для $7 \leq m \geq 19$ и $n \geq 13$ можно рассчитать показатель $F = \dfrac{(n-1)\cdot S}{n(m-1)-S}$. H_0 отвергают на критическом уровне значимости α, если $F \geq F_{\nu_1,\nu_2,\alpha}$, где $F_{\nu_1,\nu_2,\alpha}$ – α-квантиль распределения Фишера–Снедекора с $\nu_1 = m - 1$ и $\nu_2 = (m - 1)(n - 1)$ степенями свободы.

В других случаях наиболее эффективна аппроксимация, предложенная [20]. Для $m \leq 7$ и $n \geq 8$ статистику Имана–Давенпорта рассчитывают следующим образом

$$J = \frac{1}{2}[(m-1)F + S], \qquad (39)$$

H_0 отклоняют на критическом уровне значимости α, если $J \geq J_\alpha$, где:

$$J_\alpha = \frac{1}{2}\left[(m-1)F_{\nu_1,\nu_2,\alpha} + \chi^2_{(m-1),\alpha}\right], \qquad (40)$$

и $\nu 1 = m - 1$, $\nu_2 = (m - 1)(n - 1)$.

Если $m \geq 6$ и $2 \leq \nu \leq 6$ и $m = 5$, $n = 6$, то вместо J и J_α используют:

$$J^* = \frac{1}{2}\left[(m-1)(n-1)F + S\right]; \qquad (41)$$

$$J^*_\alpha = \frac{1}{2}\left[(m-1)(\mathrm{n}-1)F + S\right]. \qquad (42)$$

Пример 25. На 5 крысах изучали влияние вещества X на неустойчивость походки, вызываемую этанолом. Нарушения оценивали в порядковой шкале (табл. 7 [10]) до и через 30 и 60 мин после введения вещества (табл. 17).

Таблица 17

Влияние вещества X на неустойчивость походки, вызываемую этанолом

Table 17

Effect of substance X on gait instability caused by ethanol

Крыса	До введения		30 мин после введения		60 мин после введения	
	Баллы	Ранг	Баллы	Ранг	Баллы	Ранг
1	4	3	0	1	1	2
2	3	2,5	1	1	3	2,5
3	3	2,5	2	1	3	2,5
4	4	2,5	3	1	4	2,5
5	2	2	2	2	2	2

H_0: Нарушения походки во всех 3 временных точках не различаются, т. е. вещество не влияет на изучаемый показатель.

H_1: Под влиянием изучаемого вещества нарушения походки изменяются.

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

Рассчитаем вспомогательные величины:

$R_1 = 12{,}5$; $R_{\cdot 1} = 2{,}5$; $R_2 = 6$; $R_{\cdot 2} = 1{,}2$; $R_3 = 11{,}5$; $R_{\cdot 3} = 2{,}3$; $R_{\cdot\cdot} = 2$.

Так как у одного объекта в разных точках встречаются одинаковые оценки, используем формулу 38:

$$S' = \frac{12\sum_{j=1}^{m}(R_j - nR_{\cdot\cdot})^2}{nm(m+1) - [1/(m-1)]\sum_{i=1}^{n}\left\{\left(\sum_{j=1}^{g_i} t_{i,j}^3\right) - m\right\}};$$

$$S' = \frac{12(6{,}25 + 16 + 2{,}25)}{5\cdot 3\cdot 4 - [1/2]\cdot(6+6+6+24)} = 7{,}54;$$

$$S = 8{,}244 > s_{4;3;0;0{,}17} = 8{,}2.$$

Следовательно, нулевую гипотезу следует отклонить и принять альтернативную, т. е. влияние вещества на неустойчивость походки статистически доказано ($p < 0{,}039$).

Пример 26. У 3 крыс с острым экспериментальным инфарктом миокарда регистрировали эхокардиограмму до введения вещества А через 5, 10 и 20 мин после инъекции. Рассчитывали фракции выброса (табл. 18).

Таблица 18

Table 18

Крыса	До введения		5 мин после введения		10 мин после введения		20 мин после введения	
	ФВ	Ранг	ФВ	Ранг	ФВ	Ранг	ФВ	Ранг
1	63	1	75	4	68	3	64	2
2	58	2	65	4	59	3	57	1
3	68	2	75	4	71	3	67	1

H_0: Фракции выброса во всех 4 временных точках не различаются, т. е. вещество не влияет на изучаемый показатель.

H_1: Под влиянием изучаемого вещества фракция выброса изменяется.

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

Предварительный анализ показал, что распределение вариант значительно отличается от нормального. В связи с этим для анализа эффективности действия вещества был выбран критерий Фридмана.

Рассчитаем вспомогательные величины:

$$R_1 = 5; R_{\cdot 1} = 1{,}7; R_2 = 12; R_{\cdot 2} = 4; R_3 = 9; R_{\cdot 3} = 3; R_4 = 4; R_{\cdot 4} = 1{,}3; R_{\cdot\cdot} = 2{,}5.$$

Используем формулу 37:

$$S = \frac{12 \cdot 3}{4 \cdot (4+1)}(0{,}8^2 + 1{,}5^2 + 0{,}5^2 + 1{,}2^2) =$$

$$= \frac{36}{20}(0{,}64 + 2{,}25 + 0{,}25 + 1{,}44) = \frac{36 \cdot 4{,}58}{20} = 8{,}244;$$

$$S = 8{,}244 > s_{4;3;0{,}017} = 8{,}2.$$

Следовательно, нулевую гипотезу следует отклонить и принять альтернативную, т. е. влияние вещества на фракцию выброса статистически доказано ($p < 0{,}017$).

Результаты обработки данных с помощью критерия Фридмана представляют в виде медиан выборок, нижнего и верхнего квартилей, одновременно указывают показатель Фридмана, величину ошибки I рода (p).

После проведения анализа с помощью критерия Фридмана неизбежно возникает вопрос, в каких точках эффекты обработки статистически значимо отличаются друг от друга.

При сравнении всех эффектов обработки друг с другом возможно использовать следующий метод, основанный на ранговых суммах Фридмана:

1. Вычислить $m(m-1)/2$ модулей ранговых сумм $|R_i - R_j|$, $i < j$, где $i = 1, ..., m-1; j = i+1, ..., m$.

2. На критическом уровне значимости α отвергнуть нулевую гипотезу о равенстве эффектов обработки ($\acute{\eta}_i = \acute{\eta}_j$) и принять альтернативную ($\acute{\eta}_i \neq \acute{\eta}_j$), если $|R_i - R_j| \geq r_{\alpha,m,n}$, где $r_{\alpha,m,n}$ удовлетворяет соотношению $P_0\{|R_i - R_j| < r_{\alpha,m,n}\} = 1 - \alpha$ (значения $r_{\alpha,m,n}$ см. таблицу критических значений для множественных сравнений, основанных на ранговых суммах Фридмана [3]).

Для попарного сравнения после обработки полученных данных с помощью критерия Фридмана можно также использовать непараметрическую модификацию критерия Ньюмена–Кейлса (формула 32) [5, 17].

Во многих исследованиях сравнивать попарно все эффекты обработки нет необходимости, достаточно сравнить контрольную выборку со всеми остальными. В этом случае можно использовать следующий алгоритм, основанный на сравнении ранговых сумм Фридмана (предположим, что контролем является первая выборка):

1. Вычислить $m-1$ модулей разностей ранговых сумм $|R_i - R_1|$, $i = 2, ..., m$, R_1 – сумма рангов контрольной выборки, R_i — сумма рангов выборки, сравниваемой с контрольной.

2. При двухстороннем критерии следует отвергнуть нулевую гипотезу ($\acute{\eta}_1 = \acute{\eta}_i$) и принять альтернативную ($\acute{\eta}_1 \neq \acute{\eta}_i$), если $|R_i - R_1| \geq$, где $r^*_{\alpha,m-1,n}$ удовлетворяет соотношению $P_0\{|R_i - R_1| < r^*_{\alpha,m-1,n}, i = 2,\ldots,m\} = 1 - \alpha..$ (см. таблицу критических значений для двухсторонних множественных сравнений обработок с контролем, основанных на ранговых суммах Фридмана).

3. При использовании одностороннего критерия $r^*_{\alpha,m-1,n}$ заменяют на $r^{**}_{\alpha,m-1,n}$ (см. таблицу критических значений для односторонних множественных сравнений обработок с контролем, основанных на ранговых суммах Фридмана).

Для сравнения контрольной выборки с остальными после обработки данных с помощью критерия Фридмана можно также использовать непараметрический вариант критерия Даннета (формула 33) [5, 17].

Пример 27. Используем данные примера 26. Проведём попарное сравнение эффектов обработки, используя модули разностей ранговых сумм:

$$|R_1 - R_2| = |5 - 12| = 7 < r_{0{,}049;4;3} = 8;$$

$$|R_1 - R_3| = |5 - 9| = 4 < r_{0{,}049;4;3} = 8;$$

$$|R_1 - R_4| = |5 - 4| = 1 < r_{0{,}049;4;3} = 8;$$

$$|R_2 - R_3| = |12 - 9| = 3 < r_{0{,}049;4;3} = 8;$$

$$|R_2 - R_4| = |12 - 4| = 8 = r_{0{,}049;4;3} = 8;$$

$$|R_3 - R_4| = |9 - 4| = 5 < r_{0{,}049;4;3} = 8.$$

Таким образом, на основании проведённых расчётов можно сделать вывод о том, что статистически значимые различия на уровне $p = 0{,}049$ наблюдаются только между второй и четвёртой временными точками.

Проведём такой же анализ с помощью критерия Ньюмена–Кейлса. Проведём сортировку ранговых сумм в порядке возрастания: $R_4 = 4$; $R_1 = 5$; $R_3 = 9$; $R_2 = 12$. Рассчитаем показатели для критерия Ньюмена-Кейлса (формула 32):

$$q = \frac{R_4 - R_2}{\sqrt{\frac{nl(l+1)}{12}}} = \frac{12 - 4}{\sqrt{\frac{3 \cdot 4(4+1)}{12}}} =$$

$$= 3{,}58 < q_{0{,}05;4;\infty} = 3{,}633.$$

Так как остальные сравниваемые величины находятся между этими двумя, дальнейшие расчёты не нужны. Различия между временными точками, при обработке критерием Ньюмена–Кейлса статистически незначимы.

При таком плане эксперимента как в примере 24, исследователя, прежде всего, интересуют различия по сравнению с исходным уровнем. В связи с этим мы проведём именно такой анализ, используя двухстороннюю гипотезу:

$$|R_2 - R_1| = |12 - 5| = 7 = r^*_{0{,}046;3;3} = 7;$$

$$|R_3 - R_1| = |9 - 5| = 4 < r^*_{0{,}046;3;3} = 7;$$

$$|R_4 - R_1| = |4 - 5| = 1 < r^*_{0{,}046;3;3} = 7;$$

Таким образом, на 5-й минуте после введения изучаемый препарат статистически значимо ($p < 0{,}0185$) увеличивает фракцию выброса.

Проведём такой же анализ с помощью критерия Даннета (формула 33):

$$q'_2 = \frac{|R_{contr} - R_2|}{\sqrt{\frac{n1(l+1)}{6}}} = \frac{|5-12|}{\sqrt{\frac{3\cdot 4(4+1)}{6}}} =$$

$$= \frac{7}{3{,}16} = 2{,}214 < q'_{0{,}05;4;\infty} = 2{,}35;$$

$$q'_3 = \frac{|R_{contr} - R_3|}{\sqrt{\frac{n1(l+1)}{6}}} = \frac{|5-9|}{\sqrt{\frac{3\cdot 4(4+1)}{6}}} =$$

$$= \frac{4}{3{,}16} = 1{,}265 < q'_{0{,}05;4;\infty} = 2{,}35;$$

$$q'_4 = \frac{|R_{contr} - R_4|}{\sqrt{\frac{n1(l+1)}{6}}} = \frac{|5-4|}{\sqrt{\frac{3\cdot 4(4+1)}{6}}} =$$

$$= \frac{1}{3{,}16} = 0{,}316 < q'_{0{,}05;4;\infty} = 2{,}35.$$

Таким образом, критерий Даннета не показывает статистически значимой разницы между исходным уровнем фракции выброса и этим показателем в других временных точками после введения вещества. Можно полагать, что непараметрические варианты критериев Ньюмена–Кейлса и Даннета являются менее мощными, чем множественные сравнения, основанные на ранговых суммах Фридмана. Непараметрические модификации критериев Ньюмена–Кейлса и Даннета следует применять в тех случаях, когда таблицы критерия Фридмана не содержат нужных показателей.

Итак, мы разобрали методы статистической обработки порядковых и количественных (при невозможности применения параметрических методов) данных при различном дизайне постановки эксперимента.

Глоссарий

Квантиль в математической статистике — значение, которое заданная **случайная** величина не превышает с фиксированной **вероятностью**;

z_α — квантиль стандартного нормального распределения с критической вероятностью α;

ν — число степеней свободы;

Логнормальное распределение — распределение случайной величиной, при котором десятичные или натуральные логарифмы вариант (наблюдений) распределены по нормальному закону;

Медианой (Me) выборки называется значение варианты, делящей ранжированный ряд наблюдений на две равные части (приходящееся на середину ряда);

H_0 — нулевая гипотеза, которая предполагает, что сравниваемые величины не различаются;

H_1 — альтернативная гипотеза, которая предполагает наличие статистически значимых различий.

Ошибка I рода — вероятность того, что отвергнутая H_0 является правильной.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Цорин Иосиф Борисович
Автор, ответственный за переписку
e-mail: tsorin@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0002-3988-7724
SPIN-код: 4015-3025
д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Tsorin Iosif B.
Corresponding author
e-mail: tsorin@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0002-3988-7724
SPIN code: 4015-3025
D. Sci. in Biology, Leading researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литература / References

1. Халафян А.А. STATISTICA 6. Математическая статистика с элементами теории вероятностей. – М.: Бином; 2010. – 496 с. [Halafian A.A. STATISTICA 6. Matematicheskaya statistika s elementami teorii veroyatnostej. Moscow: Binom; 2010. (In Russ).].

2. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика. Издание 3-е. – М.: «ГЭОТАР-МЕДИА»; 2015. – 216 с. [Petrie A, Sabin C. Medical statistics at a glance. Third edition. – Wiley-Blackwell. AJohn Wiley & Sons, Ltd., Publication. 2009.].

3. Холлендер М., Вулф Д.А. Непараметрические методы статистики. – М.: «Финансы и статистика»; 1983. – 518 с. [Hollander MH, Wolfe DA. Nonparametric statistical methods. John Wiley and Sons / New York, London, Sydney, Toronto. 1973.].

4. Лакин Г.В. Биометрия. – М.: «Высшая школа»; 1990. – 352 с. [Lakin GV. Biometriya. Moscow: Vysshaya shkola; 1990. (In Russ).].

5. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика; 1998. – 459 с. [Glantz St.A. Primer of biostatistics. Fouth Edition. McGraw-Hill: Health Professions Division. New York; 1994.].

6. Рунион Р. Справочник по непараметрической статистике. – М.: «Финансы и статистика»; 1982. – 198 с. [Runyon RP. Nonparametric statistics. Acontemporary approach: Addison-Wesley Pablishing Company; 1977.].

7. Ликеш И., Ляга И. Основные таблицы математической статистики. – М.: «Финансы и статистика»; 1985. – 356 с. [J. Likes, J. Laga. Zakladni Staticke Tabulky. Praha: 1978.].

8. Янко Я. Математико-статистические таблицы. – М.: Госстатиздат; 1961. – 243 с. [Yanko Ya. Mathematic-statistic tables. Praha;1958.].

9. Iman RL. An approximation to the exact distribution of the wilcocxon-mann-whitney rank sum test statistic. *Communications in Statistics – Theory and Methods.* 1976;5(7):587-598.

10. Анохина И.П., Колик Л.Г. Методические основы поиска фармакологических средств для лечения алкоголизма и оценке их эффективности. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. 2013. – М.: ФГБУ «НЦЭСМП»; – С.310-333. [Anohina IP, Kolik LG. Methodological foundations of the search for pharmacological agents for the alcoholism treatment and evaluating their effectiveness. In book: Guidelines for conducting preclinical research of drugs. Pt. I. 2013. Moscow: FSBI "SCEEMP"; p. 310–333. (In Russ).].

11. Hodges JL, Lehmann EL. Estimates of location based on ranks tests. *Ann. Math. Statist.* 1963;34:598-611.

12. Moses LE. One sample limits of some two-sample rank tests. *J. Amer. Statist. Ass.* 1964;59:645-651.

13. Цорин И.Б. Статистическая обработка качественных (категориальных) данных в фармакологических исследованиях // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2019. – № 3. – С. 3–18. [Tsorin IB. Statistical processing of qualitative (nominal) data in pharmacological research. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2019;(3):3–18. (In Russ).]. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10050

14. Большев Л.Н. Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. Издание 3-е. М.: «Наука»; 1983. – 416 с. [Bolshev LN, Smirnova HV. Tablicy matematicheskoj statistiki. Izdanie 3-e. Moscow: «Nauka»; 1983. (In Russ).].

15. Iman RL. Use of a t-statistic as an approximation to the exact distribution of the wilcocxon signed ranks test statistic. *Commnications in Statistics.* 1974;3(8): 795-806.

16. Iman RL, Davenport JM. New approximation to the exact distribution of the Kruskal-Wallis test statistic. *Communications in Statistics – Theory and Methods.* 1976;5(14):1335–1348.

17. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика. М.: Физматлит; 2006. – 816 с. [Kobzar AI. Applied mathematical statistics. Moscow: Fizmatlit; 2006. (In Russ).].

18. Dannet CW. New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics.* 1964;20:482–4491.

19. Dunn OJ. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics.* 1964;6:241–252.

20. Iman RL, Davenport JM. Approximation of the critical region of the fbietkan statistic. *Communications in Statistics – Theory and Methods.* 1980;9(6):571–595.

Влияние фармакокинетики и биодоступности цикло-*L*-пролилглицина на проявление его основных фармакологических эффектов у экспериментальных животных

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

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

Аннотация. В работе представлены результаты изучения влияния фармакокинетики и проницаемости через ГЭБ цикло-*L*-пролилглицина на проявление его основных фармакологических эффектов у экспериментальных животных.

Ключевые слова: фармакокинетика; биодоступность для ЦНС; цикло-*L*-пролилглицин; фармакологические эффекты

Для цитирования:
Бойко С.С., Колясникова К.Н., Жердев В.П. Влияние фармакокинетики и биодоступности цикло-*L*-пролилглицина на проявление его основных фармакологических эффектов у экспериментальных животных // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2020. – № 3. – С. 25–29. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-3-25-29

The influence of the pharmacokinetics and bioavailability of cyclo-*L*-propylglycine to the manifestation of its main pharmacological effects in experimental animals

Boyko SS, Koljasnikova KN, Zherdev VP

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Abstract. In the article presented the results of research of the influence pharmacokinetics, bioavailability for CNS cyclo-*L*-prolylglycine to the manifestation of its main pharmacological effects in experimental animals.

Keywords: pharmacokinetics; bioavailability to the Central nervous system; cyclo-L-prolylglycine; pharmacological effects

For citations:
Boyko SS, Koljasnikova KN, Zherdev VP. The influence of the pharmacokinetics and bioavailability of cyclo-*L*-propylglycine to the manifestation of its main pharmacological effects in experimental animals. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2020;(3):25–29. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-3-25-29

Введение

Дипептид цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ) был впервые обнаружен в плазме и мозге крыс в качестве основного метаболита при изучении фармакокинетики ноотропного препарата ноопепт – этилового эфира *N*-фенилацетил-*L*-пролилглицина, являющегося пептидным аналогом классического ноотропного средства пирацетам [1, 2]. Структура ЦПГ была установлена методами ГЖХ-ВЭЖХ-масс-спектрометрии, дипептид был идентифицирован как эндогенное соединение в мозге крыс и показана идентичность метаболита ноопепта и эндогенного ЦПГ [3, 4]. Показано, что ЦПГ обладает ноотропной [5], антигипоксической, анксиолитической [6], нейропротективной [7] и другими видами фармакологической активности [8]. Полученные экспериментальные данные о нейротропных эффектах ЦПГ явились основанием для его углублённого фармакологического изучения с целью дальнейшего продвижения в медицинскую практику в качестве ноотропного средства со свойствами анксиолитика и нейропротектора для лечения патологий головного мозга, связанных с его гипоксически-ишемическими повреждениями, нарушениями мозгового кровообращения, инсультами и другими патологиями головного мозга, а также заболеваниями, связанными с увеличением продолжительности жизни (болезнь Альцгеймера, Паркинсона и др.).

Целью данной работы явилось изучение влияния фармакокинетики и биодоступности ЦПГ для ЦНС на проявление его основных фармакологических эффектов у экспериментальных животных.

Материалы и методы

Изучение фармакокинетики ЦПГ проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180–220 г после перорального введения водного раствора ноопепта в дозе 50 мг/кг как описано ранее [1, 2]. Идентификацию и количественное определение ЦПГ проводили методом ГЖХ-ВЭЖХ-масс-спектрометрии [3, 4]. Исследование фармакологических эффектов проводили как описано в ранее опубликованных работах [4–8].

Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму и воде. Животных содержали в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP) и нормативным документом «Санитарные правила по устройству,

оборудованию и содержанию виварием», утверждённым Главным Государственным санитарным врачом 06.04.1973 г. №1045-73 и Приказом МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Эксперименты проводили с 10 до 16 часов.

Результаты исследования

ЦПГ был обнаружен в мозге интактных крыс в качестве эндогенного соединения и было определено его количественное содержание, которое составило 2,8 нМ/г влажной массы мозга крыс [3, 4]. В то же время эндогенное происхождение этого дипептида было показано в исследованиях зарубежных авторов: он образуется в результате метаболических превращений и циклизации концевого трипептида инсулиноподобного фактора роста нервов IGF-1 [9]. При изучении фармакокинетики разработанного на основе его структуры ноотропного препарата, получившего название ноопепт, было установлено, что ЦПГ обнаруживается в качестве его основного метаболита, быстро проникает через ГЭБ, обнаруживается в мозге крыс в максимальной концентрации через 30 мин и определяется в течение продолжительного времени [1, 2]. Впоследствии в наших исследованиях была установлена идентичность эндогенного ЦПГ метаболиту ноопепта [3, 4]. На основании данных по изучению фармакокинетики ЦПГ в мозге и плазме крови крыс были рассчитаны основные фармакокинетические параметры ЦПГ, которые представлены в табл. 1.

Из данных табл. 1 видно, что ЦПГ обнаруживается в мозге крыс в максимальной концентрации через 30 мин после введения ноопепта, при этом его период полувыведения из мозга меньше по сравнению с аналогичным параметром плазмы, что может быть связано с большой величиной объёма распределения и константы элиминации ЦПГ в мозге крыс. Кроме того, это может указывать на возможное связывание ЦПГ с внутриклеточными структурами мозга вследствие его структурной близости к эндогенным нейропептидам. В пользу этого предположения свидетельствует также и величина площади под фармакокинетической кривой ЦПГ в мозге, которая значительно больше по сравнению с аналогичным параметром в плазме; тканевая доступность для мозга составляет 1,38, что указывает на хорошую проницаемость ЦПГ через ГЭБ и высокую тропность ткани мозга крыс к изучаемому дипептиду. Большая величина MRT для ЦПГ указывает на его распределение как в структурах мозга, так и в других органах и тканях крыс.

В связи с тем, что ЦПГ разрабатывался как топологический аналог пирацетама, для его дальнейшего продвижения в медицинскую практику в качестве нейропротективного препарата с ноотропным и анксиолитическим компонентами действия было проведено углублённое изучение его нейротропной активности, в результате которого было показано, что он обладает комплексом фармакологических эффектов при его системном введении в миллимолярных дозах. Так, результаты исследований ноотропной активности ЦПГ с использованием тестов УРАИ и УРПИ [5] позволили установить, что дипептид обладает ноотропной активностью, которая проявляется в большей степени у плохо обучающихся животных и у животных с ишемией мозга. Кроме того, было показано положительное влияние ЦПГ на гематологические показатели крови, улучшающие мозговое кровообращение [10], что сопровождалось улучшением когнитивных функций экспериментальных животных. Выраженность ноотропного эффекта ЦПГ связана с его высокой биодоступностью к ткани мозга крыс, на что указывает его тканевая доступность, составляющая 1,38, поэтому нельзя исключить возможность непосредственного влияния ЦПГ на внутриклеточные структуры головного мозга, принимающие участие в реализации его ноотропного эффекта. В ранее проведённом изучении структурной и внутриклеточной локализации эндогенного ЦПГ в мозге экспериментальных животных было установлено, что в большей концентрации он определяется в нейрональной фракции коры и гипоталамуса головного мозга — структурах, принимающих участие в реализации ноотропного и анксиолитического эффектов [11, 12]. В дальнейшем нами были получены данные, свидетельствующие об участии ЦПГ в проявлении других его нейротропных эффектов. Так, было показано, что ЦПГ обладает выраженным антигипоксическим и анксиолитическим эффектами у беспородных крыс при его системном введении в дозах 0,5–1,0 мг/кг [6, 7, 12]. Кроме того, при изучении этих

Таблица 1

Фармакокинетические параметры ЦПГ в плазме и мозге крыс

Table 1

Pharmacokinetic parameters of CPG in rat plasma and brain

Параметры	C_{max}, мкг/мл	T_{max}, ч	K_{el}, $ч^{-1}$	$AUC_{0\to T}$, мкг/мл·ч	$T_{1/2}$, ч	MRT, ч	f_T
Плазма	0,720±0,085	0,25±0,08	0,17±0,06	3,78±0,43	3,99±0,67	5,98±0,68	–
Мозг	1,245±0,255	0,50±0,1	0,24±0,08	5,22±0,65	2,87±0,73	4,27±0,48	1,38

Примечания: C_{max}, мкг/мл — максимальная концентрация ЦПГ; T_{max}, ч — время достижения максимальной концентрации; K_{el}, $ч^{-1}$ — константа элиминации (скорость выведения препарата); $AUC_{0\to T}$, мкг/мл·ч — площадь под фармакокинетической кривой; $T_{1/2}$, ч — период полувыведения; MRT, ч — среднее время удержания соединения в организме; f_T — тканевая доступность ЦПГ для мозга

эффектов ЦПГ у инбредных животных 2 линий была впервые установлена зависимость выраженности этих эффектов от количественного содержания эндогенного ЦПГ в мозге животных разного фенотипа [11, 12]. Так, у животных линии BALB/c содержание ЦПГ в мозге было меньше, чем в мозге стресс-устойчивой линии Blac/57, дефицит ЦПГ приводит к меньшей стресс-устойчивости животных и большей степени выраженности у этих животных анксиолитического эффекта [12]. В связи с актуальностью для современной психофармакологии создания лекарственных средств с нейропротективной активностью в сочетании с ноотропным и анксиолитическим эффектами, это направление исследований разрабатывается в России и за рубежом. В наших работах для изучения нейропротективного эффекта ЦПГ в опытах *in vitro* использовали 2 повреждающих нейроны токсических фактора — глютаматную эксайтотоксичность и 6-гидроксидофамин, которые являются общепринятыми для моделирования болезни Паркинсона и других заболеваний головного мозга, связанных с возрастом. Результаты наших исследований с использованием глютаминовой эксайтотоксичности позволили установить, что ЦПГ при предварительном введении за 24 часа до воздействия нейротоксином проявляет нейропротективный эффект в интервале концентраций 10^{-8}–10^{-5}М, при дальнейшем увеличении дозы нейропротективный эффект не только не увеличивался, напротив, несколько снижался. Терапевтический эффект восстановления жизнеспособности нервных клеток составлял 30–70 % [7, 8]. Аналогичные результаты изучения нейротропной активности были показаны и при использовании другого токсического агента — 6-гидроксидофамина [7, 8]. Нейропротективный эффект ЦПГ был показан также зарубежными учёными на разных гипоксически-ишемических моделях головного мозга при использовании разных повреждающих нейроны факторов [9]. В сводной табл. 2 представлены результаты изучения фармакологических эффектов ЦПГ у экспериментальных животных с указанием методов исследования, активных доз и концентраций изучаемого нейропептида.

Полученные результаты изучения нейропротективной активности указывают на возможность непосредственного влияния нейропептида на восстановление жизнеспособности нейрональных клеток, а его отдалённый нейропротективный эффект связан со сложным механизмом его действия. В настоящее время появились сообщения о наличии у ЦПГ антидепрессивноподобной активности, в которых с использованием метода рецепторного связывания показано влияние ЦПГ на глютаматные, GABA-, NMDA-, BDNF-рецепторы, а также на обмен моноаминов как дофамина, так и серотонина в гиппокампе и префронтальной коре мозга инбредных мышей разных линий, при этом показано, что выраженность этих эффектов проявляется в большей степени у мышей линии BALB/c, с низким содержанием эндогенного ЦПГ в целом мозге и его структурах [13–15].

Заключение

Полученные данные о нейропсихотропных эффектах ЦПГ указывают на сложный механизм действия изучаемого нейропептида, который связан не только с его различным содержанием в мозге экспериментальных животных, а также с его влиянием на рецепторные системы мозга: ГАМК-глютаматергические системы, BDNF-рецепторы и др., принимающие участие в реализации основных нейротропных эффектов ЦПГ [14, 15]. Кроме того, полученные экспериментальные данные о комплексе фармакологических эффектов ЦПГ, его оптимальные фармакокинетические параметры, высокая тканевая доступность в мозге и энзиматическая устойчивость, а также данные о его эндогенном содержании позволяют рассматривать его не только как потенциально перспективное лекарственное средство для внедрения в медицинскую

Таблица 2

Фармакологические эффекты ЦПГ у экспериментальных животных

Table 2

Pharmacological effects of CPG in experimental animals

Фармакологическая активность	Тест, животные	Активные дозы или концентрации	Ссылка
Ноотропная активность	Условный рефлекс пассивного избегания с амнезией, вызванной максимальным электрошоком, крысы	0,1–1,0 мг/кг в/б	[5]
Анксиолитическая активность	Открытое поле, мыши BALB/c	0,05–0,1 мг/кг в/б	[6]
Антигипоксическая активность	Нормобарическая гипоксия с гиперкапнией, мыши	0,5–1,0 мг/кг	[6]
Нейропротекторная активность	Модель 6-оксидофаминовой токсичности, клетки SH-SY5Y Модель глутаматной токсичности, клетки HT-22	10^{-8}–10^{-5} М	[7] [8]
Антидепрессивная активность	Неизбегаемое плавание по Порсолту, мыши BALB/c	1,0; 2,0 мг/кг хронически	[14, 15]

практику в качестве препарата для лечения коморбидных заболеваний, включая когнитивные нарушения, а также тревожные и депрессивные расстройства, но и как базисную структуру для создания новых, более перспективных нейротропных ЛС с лучшими фармакокинетическими свойствами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ

Конфликт интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Участие авторов. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бойко Светлана Семеновна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: svboyko@gmail.com
ORCID ID: 0000-0003-2177-2010
SPIN-код: 4176-8921
к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Boyko Svetlana S.
Corresponding author
e-mail: svboyko@gmail.com
ORCID ID: 0000-0003-2177-2010
SPIN code: 4176-8921
PhD in Biology, Senior Researcher of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

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

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

Жердев Владимир Павлович
e-mail: zherdevpharm@mail.ru
ORCID ID: 0000-0003-2710-7134
SPIN-код: 2213-9592
д. м. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Zherdev Vladimir P.
e-mail: zherdevpharm@mail.ru
ORCID ID: 0000-0003-2710-7134
SPIN code: 2213-9592
D. Sci. in Medicine, Professor, Head of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литература / References

1. Бойко С.С., Жердев В.П., Гудашева Т.А. и др. Фармакокинетика дипептидного аналога пирацетама с нотропной активностью ГВС-111 и его основных метаболитов // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 1997;72(2):3-6. [Boyko SS, Zherdev VP, Gudasheva TA et al. Pharmacokinetics of dipeptide analog pyracetame wich nootropic activity GWS-111 and its main metabolites. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 1997;72(2):3-6. (In Russ).]

2. Бойко С.С., Жердев В.П., Коротков С.А. и др. Фармакокинетика нового потенциального ноотропногоо дипептидного препарата ГВС-111 и его метаболитов в мозге крыс // *Химико-фармацевтический журнал*. 2001;35(9):11-13. [Boyko SS, Zherdev VP, Korotkov SA at al. Pharmacokinetics of new potencial dipeptide nootrope GWS-111 and its main metabolites in rat brain. *Khimiko-Farmatsevicheskiy Zhurnal*. 2001;35(9):11-13. (In Russ).] DOI:10.1023/A^10140824082406443.

3. Gudasheva TA, Boyko SS, Akparov VKh et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. *FEBS Lett*. 1996;391(1-2): 149-152. DOI 10.1016/0014-5793(9600722-311.

4. Gudasheva TA, Boyko SS, Ostrovskaya RU et al. The major metabolite of dipeptide piracetam analogue GVS-111 in rat brain and its similarity to endogenous neuropeptide cyclo-*L*-prolylglycine. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1997;22(3):245-52. DOI: 1007/BF03189814.

5. Гудашева Т.А., Островская Р.У., Трофимов С.С. и др. Новый эндогенный дипептид циклопролилглицин подобен пирацетаму по селективности мнемотропного эффекта // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1999;128(10):411-413. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Trofimov SS et al. New endogenous dipetide cycloprolylglicine is similar to piracetam by its mnemotropic selectivity. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 1999;128 (10):411-413. (In Russ).]

6. Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова П.Н. и др. Сходство циклопролилглицина с пирацетамом по антигипоксическому и нейропротективному эффектам // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2012;75(9):3-6. [Kolyasnikova KN, Gudasheva TA, Nazarova GA et al. Similarity of cycloprolylglycine to piracetam in antigypoxic and neuroprotective effects. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2012;75(9): 3-6. (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2012-75-9-3-6

7. Николаев С.В., Логвинов И.О., Антипов П.И. и др. Нейропротективное действие цикло-*L*-пролилглицина на моделях повреждения нейрональных клеток *in vitro* // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2017;(3):26-29. [Nikolaev SV, Logvinov IO, Antipov et al. Neuroprotective effect of cyclo-*L*-prolylglycine on models of neuronal cells damage *in vitro*. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2017;(3):26-29. (In Russ).]

8. Колясникова К.Н. Изучение механизма действия нейропептида цикло-пролилглицина и возможность создания на этой основе новых ноотропных соединений: Дис. ... канд. биол. наук. – Москва; 2018. [Kolyasnikova KN. Izuchenie mekhanizma deistviya neiropeptida tsikloprolilglitsina i vozmozhnost' sozdaniya na etoi osnove novykh nootropnykh soedinenii. [dissertation]. Moscow; 2018. (In Russ).] Доступно по: https://www.academpharm.ru/dissertation/defence/kolyasnikova. Ссылка активна на 12.12.2020.

9. Guan J. Insulin-like growth factor-1 and its derivatives potential pharmaceutical application for ischemic brain injury. R*ecent Pat CNS Drug Discov.* 2008;3(2):112-27. DOI:10.2174/157488908784534630

10. Островская Р.У., Ляпина Л.А., Пасторова В.Е. и др. Многокомпонентный антитромботический эффект нейропротективного пролил-дипептида ГВС-111 и его основного метаболита цикло-*L*-пролилглицина // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2002;(2):34-37. [Ostrovskaya RU, Lyapina LA, Pastorova VE et al. A multicomponent antithrombotic effect of the neuroprotector prolyl-containing dipeptide GVS-111 and its metabolite cyclo-*L*-prolylglycine. *Russian Journal of Experimental and Clinical pharmacology*. 2002;2:34-37. (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2002-65-2-34-37.

11. Бойко С.С., Гудашева Т.А., Вичужанин М.В. и др. Региональная и субклеточная локализация циклопролилглицина в мозге крыс // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2010;149(6):648-650. [Boiko SS, Gudasheva TA, Vichuzhanin MV et al. Regional and subcellular localization of cycloprolylglycine in the rat brain. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2010;149(6):709-711. (In Russ).]

12. Середенин С.Б., Гудашева Т.А., Бойко С.С. и др. Эндогенный дипептид циклопролилглицин проявляет селективную анксиолитическую активность у животных с выраженной реакцией страха // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2002. – Т. 133, № 4 – С. 417–419. [Seredenin SB, Gudasheva TA, Boiko SS et al. Endogenous dipeptide cycloprolylglycine shows selective anxiolytic activity in animals with manifest fear reaction. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2002;133(4):360-362. (In Russ).]

13. Жердев В.П., Бойко С.С., Колясникова К.Н. Взаимосвязь между содержанием потенциального психофармакологического средства цикло-*L*-пролилглицина в мозге экспериментальных животных и его антигипоксическим эффектом // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2020;(1):25-29. [Zherdev VP, Boyko SS, Kolyasnikova KN. The relationship between the content of the potential psychopharmacological agent cyclo-*L*-prolylglycine in the brain of experimental animals and its antihypoxic effect. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2020;(1):25-29 (In Russ).] DOI: 10/37489/2587-7836-2020-1-25-29.

14. Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Ковалев Г.И. Участие серотонинергических, глутаматных, ГАМК-ергических рецепторов в проявлении антидепрессивноподобного эффекта циклопролилглицина // *Нейрохимия*. 2019;36(3):219-228. [Abdullina AA, Vasilyeva EV, Kondrakhin EA, Kovalev GI. Participation of serotonin, glutamate, and GABA receptors in the manifestation of antidepressive-like effect of cycloprolylglycine. *Neurochemistry*. 2019;36(3):219-228 (In Russ).] DOI: 10.1134/S1027813319030026.

15. Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Кудрин В.С. и др. Влияние циклопролилглицина и его аналогов на моноаминергические системы мозга мышей BALB/c // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2020;(1):3–10. Abdullina AA, Vasilyeva EV, Kudrin VS et al. The effects of cycloprolylglycine and its analogues on brain monoaminergic systems in BALB/c mice. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2020;(1):3-10. (In Russ).] DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-3-10.

Комбинированная оральная контрацепция и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19): вопросы взаимодействия лекарственных средств

Лиманова О. А.[1], Громова О. А.[2,3], Федотова Л. Э.[1]

[1] – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иваново, Россия

[2] – ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» Российской академии наук», Москва, Россия

[3] – Центр хранения и анализа больших данных ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Аннотация. В данной статье рассматривается вопрос взаимодействия комбинированных оральных контрацептивов с ЛС, рекомендованными в лечении новой коронавирусной инфекции (COVID-19) на фармадинамическом и фармакокинетическом уровнях с оценкой степени эффективности и безопасности терапии для женского организма..

Ключевые слова: новая коронавирусная инфекция (COVID-19); комбинированные оральные контрацептивы; противовирусные; антибактериальные; противовоспалительные; антитромботические; антимигренозные; антигипертензивные; пероральные сахароснижающие; лекарственные средства (ЛС); эссенциальные микронутриенты; фармакодинамическое и фармакокинетическое взаимодействие

Для цитирования:
Лиманова О.А., Громова О.А., Федотова Л.Э. Комбинированная оральная контрацепция и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19): вопросы взаимодействия лекарственных средств // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2020. – № 3. – С. 30–39. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-3-30-39

Combined oral contraception and treatment of new coronavirus infection (COVID-19): drug interaction issues

Limanova OA[1], Gromova OA[2,3], Fedotova LE[1]

[1] – FSBEI HE "Ivanovo State Medical Academy" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ivanovo, Russia

[2] – Federal Research Center "Computer Science and Control" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

[3] – Big Data Storage and Analysis Center FSEI HPE Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Combined oral contraception and treatment of new coronavirus infection (COVID-19): issues of drug interaction This article examines the interaction of combined oral contraceptives with drugs recommended in the treatment of new coronavirus infection (COVID-19) at the pharmacodynamic and pharmacokinetic levels, with an assessment of the effectiveness and safety of therapy for the female body.

Keywords: new coronavirus infection (COVID-19); combined oral contraceptives; antiviral; antibacterial; anti-inflammatory; antithrombotic; antimigrenous; antihypertensive; oral hypoglycemic; medicinal products; essential micronutrients; pharmacodynamic and pharmacokinetic interaction

For citations:
Limanova OA, Gromova OA, Fedotova LE. Combined oral contraception and treatment of new coronavirus infection (COVID-19): drug interaction issues. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2020;(3):30–39. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-3-30-39

Актуальность

В условиях распространения новой коронавирусной инфекции (COVID-19), когда 11 марта 2020 года генеральный директор ВОЗ *Ghebreyesus T* оценил ситуацию с распространением COVID-19 как пандемию, а Национальная служба здравоохранения Китая отнесла эту инфекцию к самому высокому классу опасности – класс А инфекционных заболеваний, актуально значимым является планирование беременности, а значит необходимость контрацепции. При этом возникает множество вопросов по назначению современных комбинированных оральных контрацептивов (КОК), прежде всего степень их эффективности и безопасности при COVID-инфекции, характер взаимодействия с другими ЛС. Ответы на эти вопросы неоднозначны из-за недостаточной доказательной базы научных и клинических исследований. Кроме того, многие звенья патогенеза новой коронавирусной инфекции до сих пор остаются неясными [1, 2, 6]. В качестве противовирусных средств используются перепрофилированные ЛС с другими показаниями, например, гидроксихлорин (зарегистрован как противомалярийное ЛС), лопинавир/ритоновир (анти-ВИЧ препарат), ремдесивир (ЛС для лечения лихорадки Эбола), фавипиравир (противогриппозное ЛС), рибавирин (ЛС для лечения вирусного гепатита С, респираторно-синцитиальной инфекции). Список ЛС, в том числе не зарегистрированных в России, которые применяются для лечения COVID-19 off-labell, т. е. по неодобрённым показаниям, постоянно увеличивается [4, 6]. Поэтому, отследить рациональность, в том числе взаимодействие различных ЛС у пациентов в лечении COVID-19 инфекции, не всегда предоставляется возможным.

На текущий момент нет данных о нарушениях женской репродуктивной системы у пациентов с COVID-19, отсутствуют убедительные доказательства влияния SARS-CoV-2 на ткань яичников и эндометрий [2, 3]. Однако, основываясь на предшествующих исследованиях, предполагается потенциально негативное влияние SARS-CoV-2 на женскую репродуктивную систему. Возможно, новый коронавирус поражает гранулёзные клетки яичников и снижает качество ооцитов, что может привести к бесплодию или невынашиванию беременности. Также SARS-CoV-2 потенциально может повреждать эпителиальные клетки эндометрия и влиять на процесс имплантации эмбриона. Эти предположения требуют дальнейших исследований [3].

Также не существует никаких убедительных данных и о негативном воздействии инфекции COVID-19 на беременность, вертикальной передачи вируса SARS-CoV-2 от матери к плоду не отмечается. Однако эти выводы могут касаться лёгких или бессимптомных клинических случаев новой коронавирусной инфекции. Нельзя отрицать потенциально возможные осложнения и для матери, и для плода при тяжёлом течении инфекции, такие как фето-плацентарная недостаточность, задержка роста плода, преждевременные роды, обострение хронической соматической патологии (особенно заболеваний органов дыхания, аутоиммунных процессов, эндокринопатологии), которые становятся причиной критических состояний у женщин [2, 3]. В условиях неопределённости и непредсказуемости развития COVID-инфекции остро встаёт вопрос о планировании беременности.

В апреле 2020 года на сайте Всемирной Организации здравоохранения (ВОЗ) появилась информация, что применение всех средств гормональной контрацепции безопасно во время пандемии COVID-19. Для предотвращения нежелательной беременности рекомендуется использовать современные средства контрацепции, в том числе и КОК [1].

При присоединении COVID-инфекции у пациенток важно прогнозировать взаимодействие КОК с другими ЛС. Результатом этого процесса может быть как *синергизм*, так и *антагонизм* (не только снижение или отсутствие эффекта, но и повышение частоты побочных действий КОК/ЛС), что требует коррекции дозирования ЛС, отмены ЛС, прогнозирования развития побочных эффектов, учёта противопоказаний. Так как *взаимодействие* КОК с другими ЛС происходит в основном на фармакодинамическом (механизма действия или фармакологических эффектов) и *фармакокинетическом уровнях* (на этапе всасывания, распределения, вытеснения друг друга из связи с белками плазмы крови, изменения активности биотрансформации в печени и выведения ЛС с желчью или мочой), важно принимать во внимание клинико-фармакологические характеристики пероральных контрацептивов.

Клинико-фармакологическая характеристика современных КОК

КОК в своём составе сочетают как эстрогенный, так и гестагенный компонент. Свойства и действия КОК определяются соотношением стероидных веществ, а также их качественным составом. Эстрогенный компонент для всех видов КОК одинаков и представлен синтетическим эстрогеном этинилэстрадиолом (ЭЭ), либо эстрогеном, идентичным эндогенному (эстрадиола гемигидрат, эстрадиола валерат). Прогестагенный компонент более разнообразен, включает различные синтетические прогестагены. На основе его модификации КОК подразделяют по поколениям. Созданы три поколения, начиная с момента их синтеза. Третье, самое последнее поколение представлено производством веществ с прогестероноподобными свойствами (дезогестрел, гестоден, дроспиренон, хлормадинон). В настоящее время, по рекомендациям ВОЗ, доза эстрогенного компонента в КОК не должна превышать 35 мкг этинилэстрадиола [1], которая практически не вызывает эстроген-зависимых побочных эффектов, таких как повышение массы тела, ухудшение состояния варикозных вен, психоэмоциональных нарушений, мастодинии.

Отличительные фармакодинамические особенности комбинации ЭЭ с хлормадиноном (ХМА) в соответствующей дозировке состоят в том, что обладает выраженным прогестагенным действием (объясняется высокой аффинностью к рецепторам к прогестерону, которая на 30 % выше, чем у прогестерона), выраженно блокирует секрецию гонадотропинов. Имеет слабое глюкокортикоидное действие (за счёт тканево-специфического агонистического эффекта к глюкокортикоидным рецепторам и предполагаемой блокады фосфолипазы А2 и/или ЦОГ-2). Отличительным эффектом является выраженное антиандрогенное действие за счёт конкурентного ингибирования разных типов рецепторов андрогенов, 5-α редуктазы I типа и снижения секреции андрогенов в надпочечниках и яичниках. Комбинация лишена антиминералкортикоидной активности. Нейтрально воздействует в отношении свертывающей системы крови в отличие от гестагенов II поколения, для которых характерно повышение тромбогенного потенциала крови за счёт активации протеина С; практически не влияет на углеводный и липидный обмен, что подтверждено отсутствием изменений толерантности к глюкозе, уровня инсулинемии, периферической инсулинорезистентности и патологической дислипидемии у пациенток после года регулярного приёма [5, 8].

Содержащийся в КОК ХМА – гестаген с улучшенными фармакокинетическими свойствами. После приёма внутрь ХМА быстро и практически полностью всасывается. Системная биодоступность ХМА высокая (около 100 %), поскольку он не подвергается первичному метаболизму в печени, не блокирует

ферментативную цитохромную систему Р450. Это создаёт стабильные концентрации препарата в крови, что обеспечивает надёжную контрацепцию и хороший контроль менструального цикла. Более 95 % ХМА связывается с белками плазмы крови, преимущественно с альбумином. Не связывается с глобулином, связывающим половые гормоны (ГСПГ), в противном случае он бы вытеснил тестостерон из связи с ГСПС, в результате чего в крови повысился уровень свободного, биологически активного тестостерона и проявилось нежелательное андрогенное действие. Кроме того, ЭЭ, входящий в состав препарата, повышает уровень ГСПГ в плазме крови за счёт стимуляции в печени. Средний $T_{1/2}$ хлормадинона ацетата из плазмы крови составляет около 36–39 ч. (после многократного применения). При применении внутрь ХМА и его метаболиты выводятся в приблизительно равных количествах почками и через кишечник. Отсутствие кумуляции в организме — условие хорошего контроля менструального цикла и безопасности при длительном применении.

Этинилэстрадиол (ЭЭ) эффективен при приёме внутрь, так как этинильная группировка препарата предохраняет его от инактивации в печени. Обладает высокой селективной активностью в отношении эстрогенных рецепторов. ЭЭ всасывается в верхней части тонкого кишечника и через портальную систему попадает в печень. В печени образуются метаболиты этого гормона (сульфаты и глюкурониды) – эффект первичного прохождения. Несвязанные эстрогены попадают в общий кровоток и являются биологически активными, а конъюгированные эстрогены (до 40 % этинилэстрадиола) попадают с желчью обратно в кишечник. До 40 % этинилэстрадиола проходит через печень и возвращается в кишечник, где кишечные бактерии отделяют сульфатные и глюкуроновые группы от этинилэстрадиола и происходит повторное всасывание активного гормона. Этот феномен обозначается как энтеро-гепатическая циркуляция.

Исследования, проведённые в последние годы, указывают на положительное лечебное и профилактическое действие КОК, которое непосредственно не связано с его контрацептивным эффектом. В связи с тем, что КОК состоят из синтетических аналогов естественных половых стероидов, обладающих способностью оказывать влияние на гипоталамо-гипофизарную и половую систему женщины, они используются не только в качестве контрацепции, но и для лечения различной гинекологической патологии (предменструального синдрома, дисменореи, гиперменореи, эндометриоза, поликистоза яичников). Положительно влияют на минеральный обмен костей, способствуют профилактике постменопаузального остеопороза [5]. КОК, содержащий ХМА, обладает терапевтическим воздействием при гиперандрогении и связанных с ней патологических состояний кожи женщин (гирсутизм, акне, алопеция, себорея) [5].

Оценка взаимодействия КОК с противовирусными ЛС

Согласно Российским рекомендациям Министерства здравоохранения [4], в настоящее время следует применять несколько препаратов при лечении COVID-19. К ним относятся препараты фавипиравир, ремдесивир, умифеновир, гидроксихлорохин, азитромицин (в сочетании с гидроксихлорохином), рекомбинантный интерферон-альфа (табл. 1). В Европе разрешены и другие противовирусные ЛС (приложение 1).

Рекомендации:

• При присоединении COVID-инфекции и назначении по жизненным показаниям лопинавира/ритонавирира не рекомендуется принимать КОК из-за резкого снижения контрацептивного действия. Таким пациенткам следует перейти на негормональные средства контрацепции.

• Ремдесивир назначается с осторожностью из-за усиления гепатотоксичности в комбинации с КОК [6–8].

• Назначение рекомбинантного интерферона альфа-2β и умифеновира на фоне приёма КОК являются безопасными при лечении COVID-инфекции.

• Имеющиеся на сегодня сведения о результатах терапии другими противовирусными препаратами не позволяют сделать однозначный вывод об их эффективности или неэффективности, взаимодействие с другими ЛС до конца не изучено, в связи с чем их применение допустимо по решению врачебной комиссии в установленном порядке, в случае если потенциальная польза для пациента превысит риск их применения.

• ЛС, которые отнесены к категории X по влиянию на плод, согласно рекомендациям FDA – ремдесивир, гидроксихлорохин, фавипиравир, должны приниматься женщинами на фоне эффективной контрацепции не только на протяжении всего противовирусного курса лечения, но и в течение 6 месяцев после его завершения. При их сочетании с КОК требуется коррекция дозирования противовирусных ЛС из-за влияния на активность микросомальных ферментов печени.

Взаимодействие КОК с антибактериальными препаратами

Для пациентов с COVID-инфекцией назначение антибиотиков показано при присоединении/подозрении вторичной бактериальной пневмонии с учётом выявленной/предполагаемой патогенной микрофлоры. В амбулаторных условиях при нетяжёлой пневмонии можно продолжить приём КОК с учётом особенностей взаимодействия (табл. 2). Критерии выбора антибактериальных средств на фоне приёма КОК являются: высокая биодоступность, целенаправленный спектр действия, низкая гепатотоксичность, отсутствие влияние на микросомальные ферменты печени, микрофлору кишечника.

Таблица 1

Взаимодействие противовирусных средств с КОК

Название ЛС (механизм действия)	Этинилэстрадиол/хлормадинон (фармакодинамическое взаимодействие)	Этинилэстрадиол/хлормадинон (фармакокинетическое взаимодействие	Категория действия на плод (шкала FDA)
Фавипиравир (ингибитор РНК-зависимой РНК-полимеразы). Разрешён в условиях стационара, по показаниям — в амбулаторных условия.		Фавипиравир – выраженный индуктор цитохромных ферментов Р450 печени, снижение плазменной концентрации ЭЭ	X
Умифеновир (ингибирование гемагглютинации вируса за счёт блока spike protein). Разрешён в амбулаторных условиях.	—	—	Д
Гидроксихлорохин/азитромицин (нарушение созревания лизосом, подавление фактора некроза опухоли альфа макрофагами). Применение в условиях стационара, в амбулаторных условиях — по показаниям.	??	Невыраженное ингибирование изофермента цитохрома Р450 А4, повышение риска побочных эффектов ЭЭ	X
Рекомбинатный интерферон альфа – 2β) (ингибирование трансляции вирусного белка). Разрешён в амбулаторных условиях.	—	—	A
Ремдесивир (ингибитор РНК-зависимой РНК-полимеразы). Разрешён в условиях стационара.	??	Ремдесивир имеет эффект первичного прохождения через печень – повышение риска гепатотоксичности	X
Лопинавир/ритонавир* (ингибитор протеаз). Разрешён в условиях стационара.		Ритонавир –выраженный индуктор цитохрома Р450, снижение плазменной концентрации эстрогена, снижение эффективности КОК	C
Хлорохин* В амбулаторных условиях.	??	?? Возможно негативное действие на порфириновой обмен	X

Примечания: — – ЛС, исключённые в настоящее время из федеральных рекомендаций по лечению новой коронавирусной инфекции из-за низкой доказательной базы;

Отсутствует риск опасного взаимодействия;

Потенциальная опасность взаимодействия;

Опасное взаимодействие;

?? Взаимодействие не изучено или неизвестно.

• Пероральные формы антибиотиков с низкой биодоступностью и широким спектром действия не сочетаются с КОК из-за высокого риска дисбиоценоза и нарушения энтеро-гепатической циркуляции со снижением концентрации КОК в плазме крови (табл. 2). При одновременном применении таких ЛС с КОК необходимо использовать дополнительные барьерные методы контрацепции, как во время лечения, так и в течение 7 дней после него. При приёме действующих веществ, снижающих концентрацию ЭЭ в плазме крови за счёт индукции микросомальных ферментов печени, дополнительные барьерные методы следует применять в течение 28 дней после окончания лечения.

• При комбинации антибиотиков между собой (например, цефтриаксон с азитромицином) следует отказаться от приёма КОК из-за негативного действия на миклофлору кишечника с развитием дисбиоценоза и снижения энтерогепатической рециркуляции эстрогенов.

• Если же у пациентки с вторичной, третичной пневмонией наблюдается утяжеление состояния, особенно на фоне сопутствующей патологии (наличие хронических заболеваний, иммунодефицитного состояния, ХОБЛ, муковисцидоза, сахарного диабета, недавних перенесённых хирургических вмешательств, присоединение патогенной внутрибольничной, резистентной инфекции) антибактериальная терапия проводится в стационарных условиях, в том числе в ОРИТ с отменой пероральных контрацептивов во избежание развития септического шока.

Комбинация КОК с антитромботическими средствами

Актуальным вопросом в лечении COVID-19 женщин репродуктивного возраста является применение антикоагулянтов. Известно, что COVID-19 ассоциирован с вероятностью развития артериального или

Таблица 2

Взаимодействие КОК с антибиотиками

Название ЛС	Пероральная форма выпуска (табл., капсулы, диспергируемые таб.)	Парентеральная форма выпуска (растворы для в/м, в/в введения)
Ампициллин	Резкое угнетение микрофлоры кишечника за счёт низкой биодоступности антибиотика и широкого спектра действия, нарушение энтерогепатической циркуляции эстрогена, снижение эффекта КОК	Незначительное угнетение микрофлоры, дозозависимый эффект
Амоксициллин	Незначительное угнетение микрофлоры кишечника, но в процессе метаболизма нарушается синтез парааминобензойной кислоты в кишечнике – риск «прорывных» кровотечений	–
Амоксициллин/клавулановая кислота	Биодоступность антибиотика – 70 %, угнетение микрофлоры, связано с дозозависимым эффектом, снижение эффекта КОК	Незначительное угнетение микрофлоры, дозозависимый эффект
Кларитромицин	Кларитромицин – индуктор микросомального окисления в печени за счёт активации CYP3A4, снижение плазменной концентрации КОК и его эффективности	Индуктор микросомального окисления CYP3A4, снижение плазменной концентрации КОК и его эффективности
Азитромицин	Азитромицин не является индуктором микросомального окисления в печени. Биодоступность – 37 % из-за эффекта первичного прохождения через печень	Не является индуктором микросомального окисления в печени, высокая биодоступность
Цефиксим	Цефиксим биодоступность – 60 %, невыраженное угнетение микрофлоры, дозозависимый эффект	–
Цефтриаксон	–	Незначительное угнетение микрофлоры, дозозависимый эффект
Цефотаксим	–	Незначительное угнетение микрофлоры, дозозависимый эффект
Левофлоксацин	Левофлоксацин не является индуктором CYP450. Биодоступность 99 %	Не является индуктором CYP 450. Высокая биодоступность 99 %
Моксифлоксацин	Моксифлоксацин не является индуктором CYP450. Биодоступность 90 %	Не является индуктором CYP450. Высокая биодоступность 99 %

Примечания:
комбинация ДС опасна;
комбинация ЛС потенциально опасна, рекомендуется анализировать соотношения пользы/риска побочных эффектов;
комбинация ЛС безопасна.

венозного тромбоза, а гормональная терапия эстрогенами увеличивает риск тромбоэмболических заболеваний и даже диссеминированного внутрисосудистого свёртывания (ДВС-синдрома). Согласно последним исследованиям, приём КОК приводит к сдвигам в системе гемостаза, свидетельствующим о тенденции к гиперкоагуляции (увеличение активности фактора VIII, снижение активности антитромбина и индекса резистентности к активированному протеину С), при одновременном компенсаторном усилении фибринолиза [13, 14]. Поэтому, во время пандемии пациенткам, которые нуждаются в оптимальном средстве контрацепции, но не готовы к установке внутриматочной спирали, важно подбирать гормональные препараты, которые хорошо переносятся и практически не влияют на гемостаз [10, 12]. Такими препаратами является КОК последнего поколения, в составе которых ЭЭ с ХМА в заявленных дозах нейтральны в отношении свёртывающей системы крови, В отличие от гестагенов II поколения, они не активируют протеин С, а значит имеют низкий тромбогенный потенциал крови [5].

Для профилактики и лечения тромбозов при COVID-19 используются антитромботические средства (антикоагулянты прямого и непрямого действия, антиагреганты) (табл. 3).

Рекомендации:

Группа экспертов различных медицинских научных сообществ Испании (Испанское общество по менопаузе (SMS); Испанское общество акушеров-гинекологов (SEGO); Испанское общество по тромбозу и гемостазу (SETH)) достигла консенсуса и предложила алгоритмы ведения женщин в пери- и постменопаузе, использующих КОК, с диагнозом COVID-19 [10].

• При лёгкой или бессимптомной форме COVID-19, согласно последним рекомендациям ВОЗ применение КОК у пациенток в амбулаторных условиях может быть продолжено [10].

Таблица 3

Лекарственное взаимодействие антитромботических препаратов с КОК

Название ЛС	Этинилэстрадиол/хлормадинон фармакокинетическое взаимодействие	Этинилэстрадиол/хлормадинон фармакодинамическое взаимодействие
Эноксапарин		Антагонизм в отношении факторов свёртывания крови – IIa (тромбина), Xa – снижение антикоагулянтного действия
Нефракционированный гепарин (НФГ)	Гепарин вытесняет эстроген и гестагены из связи с альбуминами	Антагонизм в отношении факторов свёртывания крови – IIa, (тромбина), IX, Xa
Ривароксабан	Этинилэстрадиол нарушает метаболизм ривароксобана в печени за счёт конкуренции CYP450 3A4	Антагонизм в отношении фактора свёртывания крови – Xa
Апиксабан	Этинилэстрадиол нарушает метаболизм апиксабана в печени за счёт конкуренции CYP3A4	Антагонизм в отношении фактора свёртывания крови – FXa
Варфарин	Этинилэстрадиол нарушает метаболизм варфарина в печени за счёт конкуренции CYP3A4	Антагонизм в отношении факторов свёртывания крови – IIa (тромбина), VII, IX, X – снижение антикоагулянтного действия
Фондапаринукс		Антагонизм в отношении фактора свёртывания крови – антитромбина III
Ацетилсалициловая кислота (АК) в дозе 75–325 мг в сутки	АК вытесняет эстрадиол из связи с белками плазмы, риск «прорывных» кровотечений	
Клопидогрел	ЭЭ нарушает метаболизм клопидогрела (пролекарство) в печени за счёт конкуренции CYP3A4	
Дипиридамол	Конкурентный антагонизм за связи с белками плазмы крови, влияние на энтерогепатическую рециркуляцию ЭЭ	

Примечания:
комбинация ДС опасна;
комбинация ЛС потенциально опасна, рекомендуется анализировать соотношения пользы/риска побочных эффектов;
комбинация ЛС безопасна.

• При наличии факторов риска развития тромботических осложнений (пожилой возраст, сахарный диабет, артериальная гипертензия, заболевания сердечно-сосудистой системы, наследственная предрасположенность, продолжительный стаж курения и т. д.), рекомендовано перейти на прогестаген-содержащие препараты в сочетании с низкомолекулярными гепаринами (НМГ) в профилактических дозах [10].

• Госпитализированным пациенткам нужно учитывать вероятный риск развития тромбоза, как осложнения COVID-19. На время лечения рекомендовано отказаться от использования КОК и немедленно назначить использование низкомолекулярных гепаринов (НМГ) в профилактических дозах.

• При тяжёлом состоянии женщин, поступающих в отделение реанимации и интенсивной терапии, рекомендована отмена КОК и терапия НМГ в соответствии с протоколом лечебного учреждения.

• Через две недели после выздоровления женщина может возобновить применение гормональной контрацепции [10].

Взаимодействие КОК с противовоспалительными ЛС

Рекомендации:

• В качестве жаропонижающей терапии (при температуре тела выше 38,5 °C) препаратом выбора является парацетамол в дозе 500–1000 мг до 4 раз в день (не более 4 г в сутки) на протяжении 3–5 дней. Обоснованное назначение парацетамола у больных с COVID-инфекцией связано с его центральным механизмом действия, как ингибитора циклооксигеназы в ЦНС. У больных с выраженным поражением печени (жировой, алкогольный гепатоз, активная форма хронических гепатитов, выраженная печёночная недостаточность, опухоли печени) КОК необходимо отменить, а суточную дозу парацетамола уменьшить вдвое [8, 9] (табл. 4);

• У больных с COVID-инфекцией такие НПВС, как ацетилсалициловая кислота и метамизол натрия, не рекомендуется использовать из-за высокого риска развития тяжёлых осложнений – синдром Рейе (острая печёночная недостаточность и энцефалопатия), агранулоцитоз и апластическая анемия, включая случаи

Таблица 4

Взаимодействие КОК с противовоспалительными средствами (НПВС и гормонами)

Название ЛС	Этинилэстрадиол/хлормадинон фармакокинетическое взаимодействие	Этинилэстрадиол/хлормадинон фармакодинамическое взаимодействие
Парацетамол (ацетоминофен)	Этинилэстрадиол индуцирует глюкуронидацию парацетамола в печени, снижая его концентрацию в плазме крови, при этом эстроген повышает всасывание парацетамола в тонком кишечнике	Усиление гепатотоксичности (дозозависимый эффект)
Ибупрофен	Конкуренция этинилэстрадиол/хормадинона с ибупрофеном за связь с альбуминами, вытеснение и повышение плазменной концентрации ибупрофена	Возможный риск бронхоспазма вследствие угнетения липоксигеназы с образованием лейкотриенов
Ацетилсалициловая кислота в дозе 500-1000 мг в сутки	Возможная конкуренция за ЦОГ-2?	Высокий риск развития синдрома Рейе, аспириновой астмы
Анальгин (метамизол натрия)	Этинилэстрадиол подавляет активность CYP450 3A4, увеличивая концентрацию преднизолона в плазме крови	Усиление гематоксичности анальгина
Преднизолон	Этинилэстрадиол подавляет активность CYP450 3A4, увеличивая концентрацию преднизолона в плазме крови	Повышение активности преднизолона (риск побочных эффектов возрастает) за счёт однонаправленного действия на фосфолипазу А2

Примечания:

комбинация ЛС потенциально опасна, рекомендуется анализировать соотношения пользы/риска побочных эффектов;

комбинация ДС опасна.

с летальным исходом. Кроме того, НПВС (аспирин, ибупрофен, диклофенак) являются ингибиторами «тканевой» циклооксигеназы и повышают активность ЛОГ (липоксигеназы) с образование лейкотриенов, что приводит к бронхоспазму и утяжелению респираторных расстройств при COVID-инфекции [7–9];

• Как правило, глюкокортикостероидные препараты назначаются при тяжёлом течении COVID-инфекции, при развитии «цитокинового шторма», поэтому требуется отмена КОК.

Взаимодействие КОК с другими ЛС

Рекомендации:

• Если гипертоническая болезнь и сахарный диабет имеют неконтролируемое течение, особенно у больных с COVID-инфекцией, то КОК рекомендуется отменить из-за противопоказаний [5, 8].

• В лечении гипертонической болезни и сахарного диабета 2 типа (при отсутствии противопоказаний) у больных с бессимптомной и лёгкой степени COVID-инфекции необходимо учитывать снижение эффекта пероральных сахароснижающих и антигипертензивных ЛС у пациенток, принимающих КОК [5, 8].

Взаимодействие КОК с эссенциальными микронутриентами

Многочисленными научными исследованиями доказана превентивная роль в присоединении и тяжёлом развитии ОРВИ таких жизненно важных нутриентов, как витамин $Д_3$ (в суточной дозе 1000–2000 МЕ), витаминов А, С, В, РР, фолиевой кислоты цинка, магния, селена, омега- 3-ПНЖК [15–17].

Для предупреждения риска формирования «цитокинового шторма» при COVID-19 следует назначать противовоспалительные средства, одним из них является витамин Д. Он модулирует активность Т-лимфоцитов, тучных клеток, антиген-презентирующих клеток, способствует ослаблению чрезмерного воспалительного ответа, повышая уровни противовоспалительного интерлейкина 10, снижая уровни IgE, цитокинов–аларминов ИЛ-17, гистамина, лейкотриенов [15, 17].

Известно, что эстрогены, в частности этинилэстрадиол, стимулируют гуморальный ответ на вирусные инфекции и предполагается, что они могут защитить от серьёзных осложнений COVID-19. Следовательно, использование комбинированных гормональных контрацептивов, поддерживающих стабильный гормональный фон, при сочетании с витамином Д играет защитную роль при COVID-19 инфицировании [15]. Повышенные дозы витамина $Д_3$ (колекальциферола) составляют 4000–8000 МЕ/сут и назначаются пациенткам при коморбидных состояниях (бронхиальная астма, ХОБЛ, сахарный диабет, метаболический синдром, остеопороз) индивидуально под контролем концентрации 25 (ОН) $Д_3$ в плазме крови в динамике лечения.

При длительном приёме КОК вследствие их энтерогепатической циркуляции может уменьшаться син-

тез микрофлорой кишечника таких микронутриентов, как витамины группы В, особенно фолиевой кислоты, витамина К, цинка. Это определяет роль их дотации в виде витаминно-минеральных комплексов (ВМК).

N. B! Следует отметить, что аскорбиновая кислота в лечебной дозе свыше 7,5 мг/кг может подавлять сульфатирование этинилэстрадиола в кишечной стенке, повысив его уровень в плазме крови с риском развития побочных эффектов [8].

Как правило, профилактические и лечебно-профилактические витаминные, витаминно-минеральные комплексы, содержащие витамины и макро-, микроэлементы в физиологических и незначительно превышающие их суточные потребности дозах, назначаются не с лечебной, а с профилактической целью COVID-инфицирования, в том числе у женщин, принимающих КОК. По справочным данным лекарственных средств Российской Федерации, отрицательного взаимодействия КОК с этими препаратами не отмечалось.

Поэтому, в условиях пандемии женщинам, принимающих КОК при отсутствии противопоказаний, возможно использование витаминных препаратов и ВМК с целью профилактики респираторных вирусных инфекций.

Воможное взаимодействие КОК с антимигренозными ЛС

В настоящее время, многие специалисты предполагают, что SARS-CoV-2 не только воздействует на респираторный тракт, но и проникает в центральную нервную систему, вызывая неврологические расстройства (головные боли, связанные с мигренью и нарушениями мозгового кровообращения) [1, 2]. Одним из механизмов возможного вовлечения центральной нервной системы является нейроинвазия. В качестве рецептора, расположенного на поверхности нейронов и глиальных клетках головного мозга COVID-19 использует ангиотензинпревращающий фермент 2 типа. Взаимодействие коронавируса SARS-CoV-2 с этими рецепторами может приводить к прямому повреждению церебральных сосудов и нейронов без развития воспаления. Особое внимание уделяется и аутоиммунному воздействию вируса на нейротрансмиттеры (серотонин, ГАМК) и структуры ЦНС.

Известно, что менструальная мигрень возникает на фоне снижения уровня эстрогенов, а значит КОК может предотвращать или ослаблять приступы мигрени. Благодаря различным механизмам воздействия на серотонинергическую систему, эстрогены участвуют в процессах нейрональной возбудимости, регуляции сосудистого тонуса, передачи болевого сигнала, что доказывает наличие взаимосвязи между колебаниями уровня эстрогена во время менструального цикла и возникновением менструальной мигрени [11]. Лечение складывается из купирования приступов и их профилактики. Для профилактики менструальной мигрени у пациенток, которые нуждаются в контрацепции, отдают предпочтение монофазным низкодозным препаратам с содержанием этинилэстрадиола от 20 до 35 мкг.

Положительным моментом менструальной мигрени является возможность точно предсказывать начало наступления приступа головных болей. Именно поэтому многие врачи предлагают за 2 дня до менструации принимать комплекс из триптанов (суматриптан, золмитриптан, олмотриптан, ризатриптан), НПВС и эстрогенсодержащих препаратов как средств профилактики и продолжать приём в течение 5-7 дней. При назначении пациентке КОК необходимо быть уверенным, что пациентка не курит и не имеет других факторов, которые могут способствовать развитию ишемии головного мозга [11].

Рекомендации:

• У пациенток с COVID-инфекцией, страдающих менструальной мигренью, клинических исследований, изучающих эффективность, безопасность взаимодействия антимигренозных препаратов и КОК не проводилось. Стоит предположить, что комбинация триптанов и эстрогенсодержащих препаратов возможна у пациентов с лёгким и бессимптомным течением без риска/низкого риска развития ишемического инсульта. Для выявления основных и дополнительных факторов риска нарушения мозгового кровообращения, особенно у больных с новой коронавирусной инфекцией, требуется проведение дополнительных клинико-диагностических неврологических методов исследования.

• Применение гормональной контрацепции при мигрени с аурой, которая не является проявлением менструальной мигрени, абсолютно противопоказано. Последние статистические данные свидетельствуют о том, что мигрень с аурой увеличивает риск развития ишемического инсульта, поэтому применение гормональных препаратов, включающих в свой состав эстрогены, которые через каскад реакций могут приводить к спазму сосудов, является опасным для здоровья женщины, особенно у больных с COVID-инфекцией [11].

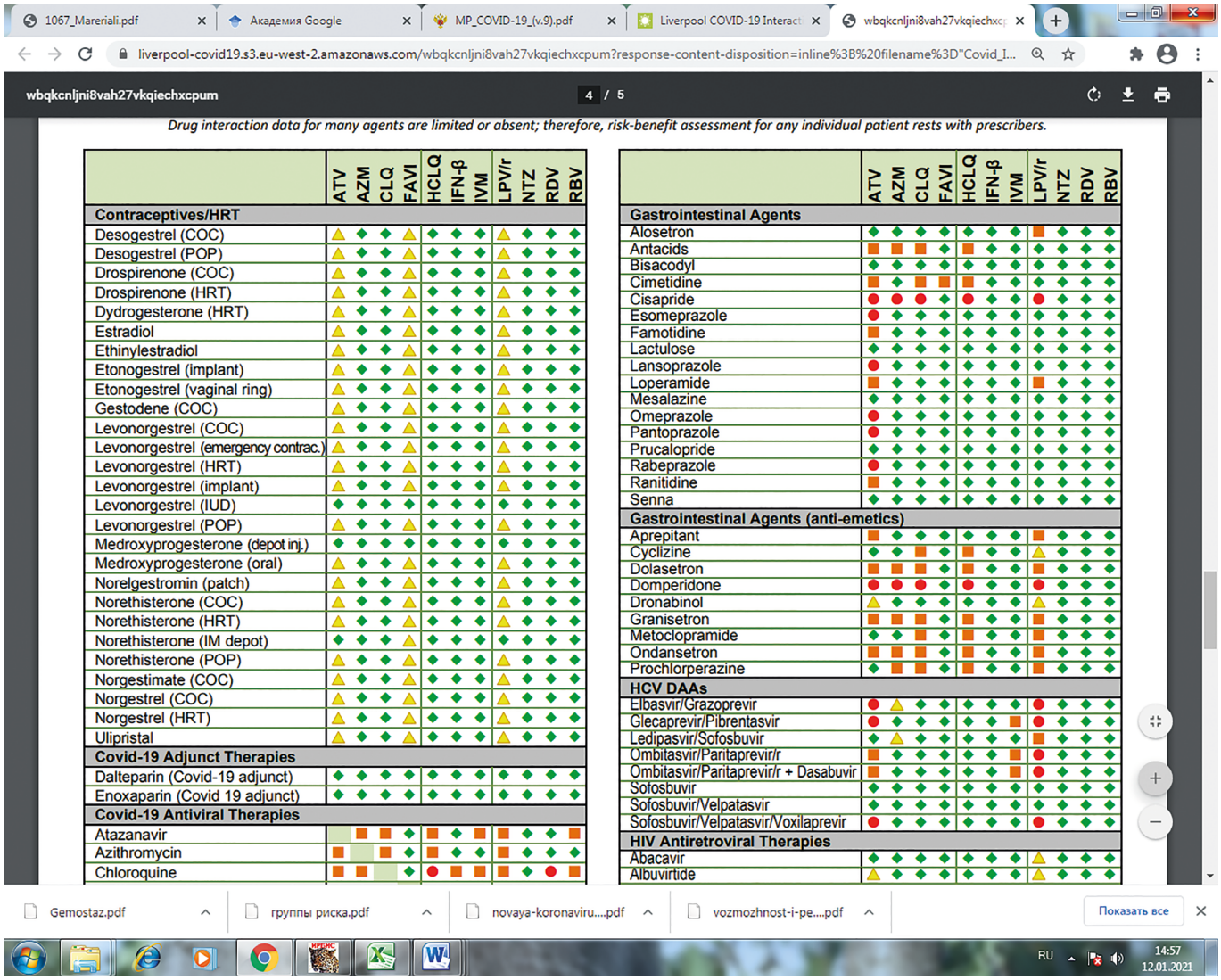
Заключение

Во время пандемии коронавируса COVID-19 по заявлению Всемирной организации здравоохранения нет данных, препятствующих использованию гормональных контрацептивов. Для предотвращения нежелательной беременности рекомендуется использовать современные средства контрацепции, в том числе КОК.

Для пациентов с COVID-инфекцией оценка взаимодействия КОК с другими ЛС должна осуществляться индивидуально. С одной стороны, необходимо принимать во внимание факторы риска, степень тяжести COVID-инфекции, осложнения, условия лечения, наличие коморбидных состояний и противопоказаний. С другой стороны, учитывать данные фармакокинетики и фармакодинамики ЛС, их взаимодействие при соотношении пользы к риску развития побочных реакций с обязательным мониторингом состояния больных.

Приложение 1

Liverpool Drug Interaction Croup, University of Liverpool Pharmacology Research Labs, 2020



Обозначения:

ATV	Атазанивир
AZM	Азитромицин
CLO	Хлорохин
FAV	Фавипиравир
HCLO	Гидроксихлорохин
JFN-β	β-интерферон
IVM	Ивермектин
LPN/r	Лопинавир/ритонавир
NTL	Нитозаксонид
RDV	Ремдесивир
RBV	Рибавирин
	сочетание препаратов опасно
	потенциально опасное сочетание
	данные по опасному взаимодействию отсутствуют

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ

Конфликт интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Участие авторов. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Лиманова Ольга Адольфовна
ORCID ID: 0000-0002-2342-3036
к. м. н, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России, Иваново, Россия

Громова Ольга Алексеевна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: unesco.gromova@gmail.com
ORCID ID: 0000-0002-7663-710X
SPIN-код: 6317-9833
д. м. н, профессор, в. н. с., научный руководитель Института фармакоинформатики при ФИЦ ИУ РАН, Москва, Россия; ЦХАБД НОЦ ЦЭ МГУ имени М.В. Ломоно-сова, Москва, Россия

Федотова Любовь Эдуардовна
ORCID ID: 0000-0002-0778-1562
к. м. н., доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России, Иваново, Россия

Limanova Olga A.
ORCID ID: 0000-0002-2342-3036
PhD in Medicine, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russia

Gromova Olga A.
Corresponding author
e-mail: unesco.gromova@gmail.com
ORCID ID: 0000-0002-7663-710X
SPIN code: 6317-9833
D. Sci. in Medicine, Professor FRC CSC RAS, Moscow, Russia; Big Data Storage and Analysis Center Lomonosov MSU, Moscow, Russia

Fedotova Lyubov E.
ORCID ID: 0000-0002-0778-1562
PhD in Medicine, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russia

Литература / References

1. WHO. Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. Interim guidance. 13 March 2020. Accessed April 20, 2020. Available at: https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acuterespiratory-infection-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-issuspected

2. Jin JM, Bai P, He W et al. Gender Differences in Patients with COVID-19: Focus on Severity and Mortality. Front Public Health. 2020;8:152. DOI: 10.3389/fpubh.2020.00152

3. Адамян Л.В., Азнаурова Я.Б., Филиппов О.С. COVID-19 и женское здоровье (обзор литературы) // Проблемы репродукции. 2020;26(2):6-17. [Adamyan LV, Aznaurova YaB, Filippov OS. COVID-19 and women's health (literature review). *Problemy Reproduktsii (Russian Journal of Human Reproduction)*. 2020;26(2):6-17. (In Russ).] DOI: 10.17116/repro2020260216

4. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 9 (26.10.2020). [Vremennye metodicheskie rekomendacii «Profilaktika, diagnostika i lechenie novoj koronavirusnoj infekcii (COVID-19)». Version 9 (26.10.2020). (In Russ).] https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/052/550/original/%D0%9C%D0%A0_COVID-19_%28v9%29.pdf?1603788097

5. Инструкция по медицинскому применению препарата Белара рег. №: П N014429/01 от 24.12.08. Бессрочно. Дата перерегистрации: 30.09.19. [Instructions for the medical use of the drug Belara. №: П N014429/01 от 24.12.08. Bessrochno. Data pereregistracii: 30.09.19. (In Russ).]. Доступно по: https://www.vidal.ru/drugs/belara__2719

6. Колбин А.С. COVID-19 и клиническая фармакология // *Клиническая фармакология и терапия*. 2020;29(3):14-24. [Kolbin AS. COVID-19 and clinical pharmacology. *Clinical pharmacology and therapy*. 2020;29(3):14-24. (In Russ).]

7. Вышковский Г.Л. Регистр лекарственных средств России. РЛС Энциклопедия лекарств. – М.: РЛС-ПАТЕНТ; выпуск 20/2012. – 1368 с. [Vyshkovsky GL. Registr lekarstvennyh sredstv Rossii. RLS Enciklopediya lekarstv. Moscow: RLS-PATENT; issue 20/2012. (In Russ).]

8. Реестр лекарственных средств. Электронная энциклопедия лекарств. 2020. [Vyshkovsky GL. Registr lekarstvennyh sredstv. Электронная энциклопедия лекарств. 2020. (In Russ).]
Доступно по: https://rlsnet/ ссылка активна на 15.12.2020

9. Кукес В. Г. Клиническая фармакология : учебник / под ред. В. Г. Кукеса Д. А. Сычева. – 5-е изд., испр. и доп. – Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2017. – 1024 с. [Kukes VG. Klinicheskaya farmakologiya : uchebnik / Ed by VG Kukes, DA Sychev. 5-e izd., ispr. i dop. Moscow: GEOTAR-Media, 2017. (In Russ).] ISBN 978-5-9704-4196-1

10. Поиск определений во время неопределенности. Пандемия в практике гинеколога. [интернет]. Гедеон Рихтер. [Finding definitions in a time of uncertainty. A pandemic in the practice of a gynecologist. [Internet]. *Gedeon Richter*. (In Russ).] Доступно по: https://doctor.g-richter.ru/specprojects/poisk-opredeleniy-vo-vremya-neopredelennosti-pandemiya-v-praktike-ginekologa/ ссылка активна на 12.12.2020.

11. Романенкова Ю.С., Кузьминова Т.И., Кызымко М.И. Влияние комбинированных оральных контрацептивов на женщин с мигренью // *Акушерство, гинекология и репродукция*. 2018;12(1):86-92. [Romanenkova JS, Kuzminova TI, Kyzymko MI. Effect of combined oral contraceptives on women with migraine. Obstetrics, gynecology and reproduction [Akusherstvo, ginekologiya i reproduktsiya]. 2018;12(1):86-92. (In Russ).] DOI: 10.17749/2313-7347.2018.12.1.086-092

12. Унанян А.Л., Аракелов С.Э. и др. Дисменорея: практические аспекты патогенеза, клиники и терапии // *«Доктор.Ру» Гинекология Эндокринология*. 2014:1(89):13-17. [Unanyan AL, Arakelov SE et al. Dysmenorrhea: Practical Issues of Pathogenesis, Clinical Presentation and Treatment. *Doctor.Ru Gynecology Endocrinology*. 2014:1(89):13-17. (In Russ).]

13. Driggin E, Madhavan MV, Bikdeli B et al. Cardiovascular considerations for patients, health care workers, and health systems during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. J Am Coll Cardiol. 2020 May 12;75(18):2352-2371. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.03.031.

14. Tang N, Bai H, Chen X et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost*. 2020 May;18(5):1094-1099. DOI: 10.1111/jth.14817.

15. Громова О.А., Торшин И.Ю., Малявская С.И, Лапочкина Н.Р. О перспективах использования витамина D и других микронутриентов в профилактике и терапии COVID-19 // РМЖ. 2020;(9):32-38. [Gromova OA, Torshin IYu, Malyavskaia SI, Lapochkina NP. About the prospects of using vitamin D and other micronutrients in the prevention and therapy of COVID-19. RMJ. 2020;(9):32-38. (In Russ).]

16. Громова О.А. Торшин И.Ю. Важность цинка для поддержания активности белков врожденного противовирусного иммунитета: анализ публикаций, посвященных COVID-19 // *Профилактическая медицина*. 2020;23(3):131-139. [Gromova OA, Torshin IYu. The importance of zinc in maintaining the activity of antiviral innate immunity proteins: analysis of publications on COVID-19. *The Russian Journal of Preventive Medicine*. 2020;23(3):131–139. (In Russ).] DOI: 10.17116/profmed20202303113

17. Громова О.А., Торшин И.Ю., Учайкин В.Ф. Микронутриенты, поддерживающие врожденный иммунитет против коронавирусов: результаты систематического компьютерного анализа публикаций по COVID-19 и белков противовирусной защиты протеома человека // *Фармакология & Фармакотерапия*. 2020;(1):9-25. [Gromova OA, Torshin IYu, Uchaykin VF. Micronutrients supporting innate immunity against coronaviruses: results of a systematic computer analysis of publications on COVID-19 and human proteome antiviral proteins. *Pharmacology & Pharmacotherapy*. 2020;(1):9-25. (In Russ).] DOI: 00110.46393/2713-2129_2020_1_9

Сравнительное изучение нейропротекторной активности соединений лития и их влияния на течение экспериментального аллоксанового сахарного диабета у крыс

Назаренко О. А.[1], Демидов В. И.[1], Громова О. А.[2,3], Алексахина Е. Л.[1], Торшин И. Ю.[2,3]

[1] – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, Россия

[2] – ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» Российской академии наук», Москва, Россия

[3] – Центр хранения и анализа больших данных ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Аннотация. Проведено сравнительное исследование эффектов неорганической соли лития (карбоната лития) и органической соли лития (аскорбат лития) на модели аллоксанового сахарного диабета. Применение аскорбата лития в течение месяца при экспериментальном аллоксановом сахарном диабете облегчает его течение – повышается выживаемость животных, снижается уровень гликемии (особенно при введении в дозе 10 мг/кг). Морфометрический анализ показал, что аскорбат лития при аллоксановом диабете оказывает нейропротекторное действие, что проявляется в уменьшении токсического повреждения нейроцитов с увеличением количества клеток с обратимыми изменениями и неповреждённых нейронов. Карбонат лития в дозах 5 и 10 мг/кг не был эффективен.

Ключевые слова: карбонат лития; аскорбат лития; аллоксановый сахарный диабет; крысы

Для цитирования:
Назаренко О.А., Демидов В.И., Громова О.А., Алексахина Е.Л., Торшин И.Ю. Сравнительное изучение нейропротекторной активности соединений лития и их влияния на течение экспериментального аллоксанового сахарного диабета у крыс // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2020. – № 3. – С. 40–47. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-3-40-47

Comparative study of the neuroprotective activity of lithium compounds and their effect on the course of experimental alloxan diabetes mellitus in rats

Nazarenko OA[1], Demidov VI[1], Gromova OA[2,3], Aleksakhina EL[1], Torshin IYu[2,3]

[1] – FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russia

[2] – Federal Research Center "Computer Science and Control" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

[3] – Big Data Storage and Analysis Center FSEI HPE Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. A comparative study of the effects of an inorganic lithium salt (lithium carbonate) and an organic lithium salt (lithium ascorbate) on a model of alloxan diabetes mellitus was conducted. The use of lithium ascorbate for a month in experimental alloxan diabetes mellitus facilitates its course – the survival rate of animals increases, the level of glycemia decreases (especially when administered at a dose of 10 mg/kg). Morphometric analysis showed that lithium ascorbate in alloxan diabetes has a neuroprotective effect, which is manifested in a decrease in toxic damage to neurocytes with an increase in the number of cells with reversible changes and intact neurons. Lithium carbonate at doses of 5 and 10 mg / kg was not effective.

Keywords: lithium carbonate; lithium ascorbate; alloxan diabetes mellitus; rats

For citations:
Nazarenko OA, Demidov VI, Gromova OA, Aleksakhina EL, Torshin IYu. Comparative study of the neuroprotective activity of lithium compounds and their effect on the course of experimental alloxan diabetes mellitus in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2020;(3):40–47. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-3-40-47

Введение

По данным Международной Федерации Диабета, в настоящее время во всём мире зарегистрировано 450 млн больных сахарным диабетом. Согласно прогнозам ВОЗ, к 2030 году сахарный диабет выйдет на седьмое место среди причин смерти [1]. Сахарный диабет развивается при недостаточности инсулина и характеризуется тяжёлыми метаболическими нарушениями и развитием осложнений со стороны многих органов и систем – сердечно-сосудистой, нервной систем, почек.

В регуляции углеводного обмена, развитии и течении сахарного диабета большую роль играет микро- и макроэлементный статус организма. Установлено, что при дефиците магния, кальция, цинка, хрома, лития в организме происходят нарушения метаболизма углеводов и стимулируется развитие инсулинорезистентности и глюкозотолерантности [2].

В частности, установлено участие ионов лития в метаболизме простых сахаров (в т. ч. регуляции секреции инсулина [3]), в обмене липидов [4]. Известно, что литий тормозит избыточный глюконеогенез в печени [5]. Скорость натриево-литиевого противотранспорта в эритроцитах (Na/Li ПТ) зависит от степени выраженности инсулинорезистентности [6] и отражает состояние пациентов с инсулинозависимым

сахарным диабетом (у пациентов с диабетом Na/Li ПТ > 0,40 ммоль/ч/л при применении лития это соотношение уменьшается). Ионы лития, совместно с инозитолфосфатами, участвуют в регуляции секреции инсулина клетками [7] и также повышают чувствительность различных типов клеток к инсулину [8]. В инсулинорезистентных клетках ионы лития способствуют активации транспорта глюкозы внутрь клетки за счёт потенцирования внутриклеточных сигнальных путей инсулина (в частности, сигнального белка p38-MAPK) [8].

Одним из наиболее распространённых осложнений диабета является диабетическая полинейропатия, приводящая к повреждениям периферических нервных путей. Ионы лития играют существенную роль в регуляции нейромедиаторного баланса, поддержании баланса нейротрофических факторов и во многих других физиологических процессах, важных для центральной и периферической нервной системы. В частности, экспериментальные и клинические исследования неорганических и органических солей лития указали на нейропротективный эффект ионов лития в условиях ишемии мозга и дефицита глюкозы [9, 10], при избыточном апоптозе нейронов гиппокампа в экспериментальной модели менингита.

Установлены также нейропротективные (в частности, при ишемии мозга) и нейротрофические эффекты ионов лития, связанные с ростом и развитием нейронов. Так, каскад Wnt – один из сигнальных путей, регулирующих рост и деление всех типов клеток. Ионы лития активируют сигнальные пути Wnt и PI3K/PKB, стимулируя выживание нейронов и других типов клеток нервной системы [11].

Для усиления биологических эффектов лития (в частности, за счёт улучшения транспорта ионов лития внутрь нейронов) могут использоваться органические анионы, например, аскорбат-анион. Аскорбат лития проявляет более высокое сродство к различным типам рецепторов по сравнению с другими соединениями лития. Аскорбат-анион также может оказывать анксиолитический, умеренный антикоагуляционный, антигиперлипидемический, антигипергликемический и антиоксидантный эффекты [12].

Таким образом, исследование эффектов солей лития на течение диабета и его осложнений, приводящих к повреждениям нервной системы, представляет собой перспективное направление исследований. В настоящей работе проведено сравнительное изучение влияния органических и неорганических солей лития на течение аллоксанового сахарного диабета у крыс и на поражение центральной нервной системы.

Материалы и методы

Эксперимент проведён на 40 белых крысах массой 180–250 г. Животные были разделены на 5 групп по 8 особей, в которых на день «0» воспроизводилась модель сахарного диабета, вызванного введением аллоксана (аллоксангидрата). Аллоксангидрат вводили однократно подкожно в виде 10 % раствора в дозе 100 мг/кг после 18-часового голодания.

После воспроизведения модели диабета 1-я группа являлась контрольной, а животные 2-й, 3-й, 4-й и 5-й групп получали в течение 30 дней водные растворы солей лития, внутрижелудочно, в различных дозах (в расчёте на элементный литий): 2-я группа – карбонат Li в дозе 5 мг/кг; 3 группа – карбонат Li в дозе 10 мг/кг; 4-я группа – аскорбат Li в дозе 5 мг/кг; 5-я группа – аскорбат Li в дозе 10 мг/кг.

На день 30 производили декапитацию животных; в полученной крови определяли уровень малонового диальдегида (методом Jagi), глюкозы (глюкозооксидазным методом) с помощью стандартных наборов. Проводилась оценка интенсивности перекисного окисления липидов методом индуцированной хемилюминесценции посредством измерения содержания свободных радикалов и антиоксидантного потенциала крови. Определяли следующие показатели: индекс I_{max} – максимальная интенсивность свечения, показывающая потенциальную способность биологического объекта к свободнорадикальному окислению; индекс S – величина, соответствующая обрыву цепи свободнорадикального окисления и поэтому обратно пропорциональная антиоксидантной активности пробы крови; $tg(-2\alpha)$ – показатель антиоксидантной системы защиты, характеризующий скорость её восстановления.

Патогистологическое исследование секционного материала головного мозга. После краниотомии головной мозг извлекался целиком и фиксировался в 10 % растворе нейтрального формалина, через 1 сутки с помощью фронтальных разрезов выделялась зона прецентральной извилины переднего мозга, мозжечок, ствол головного мозга. Проводка нервной ткани осуществлялась по стандартной схеме (обезвоживание в этиловом спирте, ксилоле) с последующим изготовлением парафиновых блоков. Изготовленные на санном микротоме «Microm» гистологические срезы толщиной 5–6 мкм окрашивались гематоксилином и эозином. Дубликаты срезов с помощью набора реактивов компании «Биовитрум» были окрашены по методу Ниссля и импрегнированы серебром.

Морфометрическое исследование гистологических срезов проводилось на анализаторе изображения «BioVision» (Австрия) и заключалось в подсчёте повреждённых нейроцитов пирамидного слоя коры полушарий переднего мозга в 10 различных полях зрения с последующей статистической обработкой результатов. Микрофотографии получены с помощью исследовательского микроскопа «Micros» и цифровой окулярной камеры DCM 900. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 6.

Результаты и обсуждение

Уже на второй день после введения аллоксана во всех группах крыс наблюдались изменения их общего состояния: вялость, снижение двигательной активности, замедленность реакций, у некоторых крыс – судорожные подергивания мышц. В течение первой недели отмечались летальные случаи. В первой группе летальность составила 50 %, во 2-й и 3-й – 75 %, в 4-й – 0 %, в 5-й – 12,5 %. Таким образом, применение карбоната лития достоверно повышало летальность животных ($p < 0,05$ по тесту χ^2), а аскорбата лития, наоборот, достоверно повышало выживаемость животных ($p = 0,033$ по тесту χ^2) по сравнению с контролем (рис. 1).

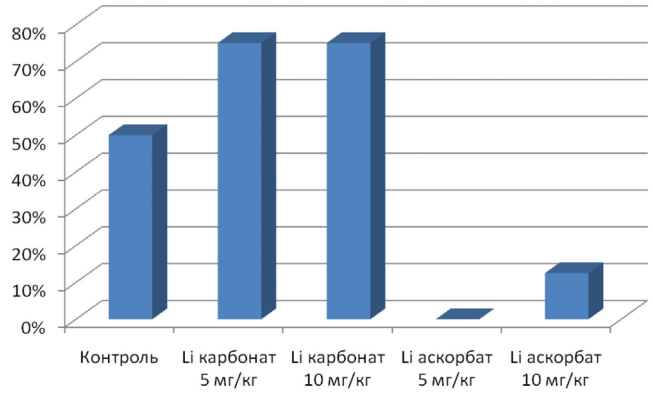


Рис. 1. Смертность крыс при приёме различных солей лития. Карбонат повышает смертность, а аскорбат лития, наоборот, снижает

При использовании обеих доз аскорбата лития достоверно снижались уровни глюкозы как по сравнению с контрольной группой (10,60 ± 0,75 ммоль/л), так и по сравнению с группами крыс, получавших карбонат лития (10–40 ммоль/л, табл. 1, рис. 2). Отмечен дозозависимый эффект снижения уровней глюкозы при использовании аскорбата лития: доза в 10 мг/кг приводила к более выраженному снижению уровней глюкозы (до 5,81 ± 0,55 ммоль/л), чем доза в 5 мг/кг (7,8 ± 0,7 ммоль/л).

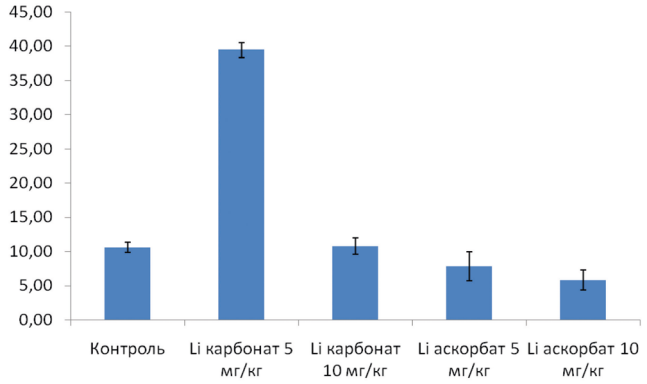


Рис. 2. Значение уравнений глюкозы при использовании различных солей лития

Показатели интенсивности свободнорадикального окисления – уровень МДА, I_{max} и индекс S также достоверно снижались при использовании аскорбата лития в дозе 5 мг/кг, а в дозе 10 мг/кг имели отчётливую тенденцию к снижению (табл. 1). При использовании карбоната лития как в дозе 5 мг/кг, так и в дозе 10 мг/кг данные показатели достоверно не отличались от показателей контрольной группы.

При гистологическом исследовании было установлено, что воспроизведение модели аллоксанового диабета приводило к нарушениям кровообращения, которые характеризовались гемостазом в капиллярах и венулах с развитием выраженного периваскулярного и перицеллюлярного отёка нервной ткани (рис. 3А).

Повреждение нейроцитов коры больших полушарий, ствола головного мозга и мозжечка носило двойственный характер. Наряду с токсическим, были выявлены признаки ишемического повреждения. Токсическое повреждение нейроцитов характеризовалось острым набуханием пирамидных клеток с округлением клеточного тела, набуханием аксона, гомогенизацией цитоплазмы с исчезновением грануляций Ниссля, нарушением контуров ядра (рис. 3Б). Гибель нейронов, подвергшихся токсическому воздействию, наблюдалась преимущественно в коре больших полушарий и сопровождалась колликвационным некрозом клеток с последующей нейрофагией (рис. 3В). В условиях

Таблица 1

Значения биохимических показателей у крыс с аллоксановым сахарным диабетом на день 30 после применения различных солей лития

Показатель Группа	Глюкоза, ммоль/л	МДА, ммоль/л	I_{max}, ед.	S, ед.	tg(–2α)
1-я (контроль)	10,60 ± 0,75	9,41 ± 0,51	149,50 ± 1,84	1138 ± 36	–44,63 ± 2,65
2-я (карбонат лития 5 мг/кг)	39,45 ± 1,10	11,06 ± 1,98	155,0 ± 4,0	994 ± 5	–48,75 ± 5,25
3-я (карбонат лития 10 мг/кг)	10,73 ± 0,20	10,94 ± 2,01	148,50 ± 9,50	1076 ± 91	–45,0 ± 0,01
4-я (аскорбат лития 5 мг/кг)	7,8 ± 0,74*^»	9,20 ± 0,40	141,60 ± 2,51*	1005 ± 16*	–42,75 ± 1,72
5-я (аскорбат лития 10 мг/кг)	5,81 ± 0,55*^»	8,78 ± 0,27	140,50 ± 5,80	1070 ± 17	–40,92 ± 1,99

Примечания: Достоверные отличия: * – при сравнении с контролем (1-я группа); ^ – сравнение с 2-й группой; « – сравнение с 3-й группой.

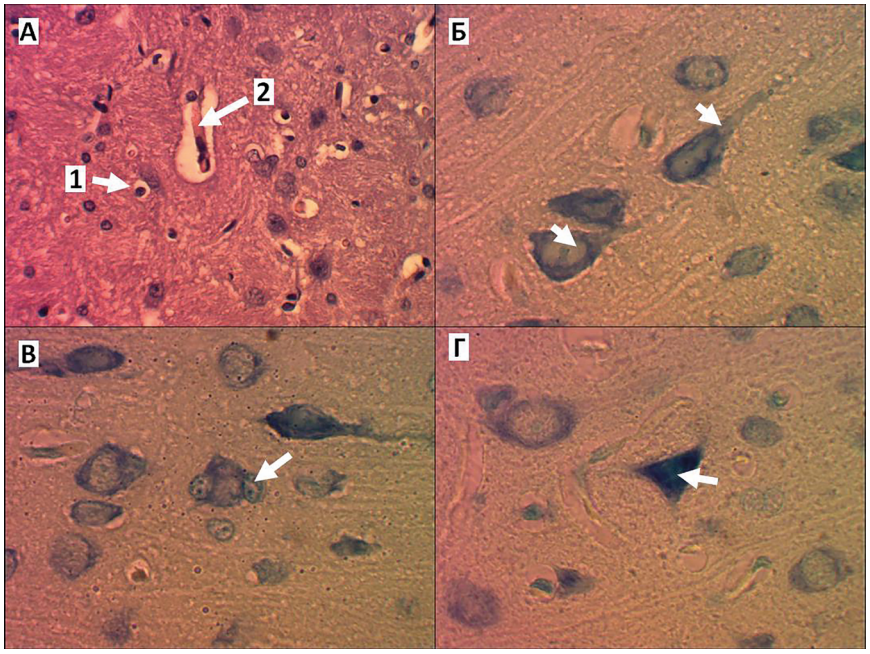


Рис. 3. Результаты гистологического анализа образцов мозга после воспроизведения модели аллоксанового диабета
Примечания: А – Выраженный перикапиллярный (1) и перицеллюлярный (2) отёк белого вещества больших полушарий. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение × 480. В одном наблюдении выявлено образование фибриново-эритроцитарных тромбов в просветах мелких артерий и артериол. Б – Острое набухание пирамидных клеток с субтотальным хроматолизом, нарушением контуров ядра. Окраска толуидиновым синим по Нисслю. Увеличение × 1200. В – Некроз нейроцитов коры больших полушарий с инициацией нейрофагии. Окраска толуидиновым синим по Нисслю. Увеличение × 1200. Г – Гиперхроматоз, пикноз нейроцитов коры больших полушарий. Окраска толуидиновым синим по Нисслю. Увеличение × 1200

выраженного расстройства внутримозгового кровообращения ишемическое повреждение имело форму необратимых изменений нейронов коры больших полушарий и характеризовалось гиперхроматозом, пикнозом нейроцитов с последующим глыбчатым распадом и перифокальной реакцией глиальных элементов (рис. 3Г).

В структуре общей картины обратимых и необратимых повреждений нейронов преобладали формы токсического поражения нервных клеток, что могло быть обусловлено быстро развивающимся кетоацидозом (2–3 сутки эксперимента). В частности, патогистологический анализ состояния ассоциативных и коммисуральных нервных волокон больших полушарий выявил признаки распространённой демиелинизации проводящих путей, которые характеризовались сегментарным распадом миелина с неравномерной окраской волокон (рис. 4).

На фоне использования карбоната лития (5 мг/кг) в нервной ткани больших полушарий головного мозга расстройства кровообращения носили выраженный характер с развитием периваскулярного и перицеллюлярного отёка. В мозжечке и стволе головного мозга отёк нервной ткани оказался умеренно выраженным. При оценке степени повреждения нейронов изменилось соотношение клеток с необратимыми и обратимыми изменениями (см. табл. 2) при сохраняющемся балансе морфогенетических вариантов гибели нейронов в сравнении с контрольной группой. При изучении зон головного мозга, содержащих

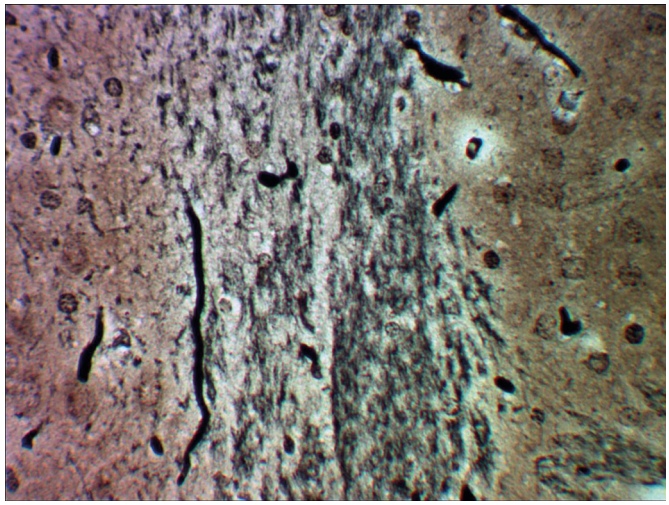


Рис. 4. Коммисуральные волокна имеют прерывистые контуры за счёт диффузно-очаговой демиелинизации
Примечания: Импрегнация серебром. Увеличение × 480

проводящие пути, выявлено набухание миелиновых волокон с неравномерным распределением миелина, варикозными утолщениями по ходу волокон (рис. 5А).

При использовании карбоната лития в дозе 10 мг/кг расстройства кровообращения в микроциркуляторном русле (МЦР) характеризовались диффузно-очаговым гемостазом в капиллярах, формированием фибриново-эритроцитарных тромбов в артериолах, дилатацией и полнокровием венул, выраженным перикапиллярным и перицеллюлярным отёком нервной ткани коры и

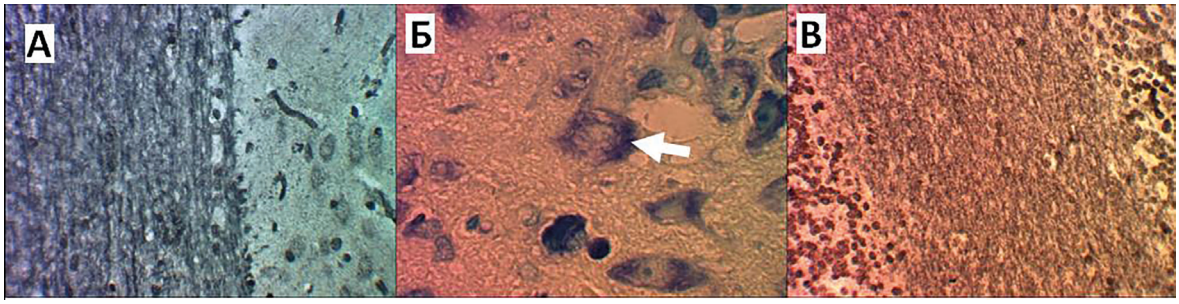


Рис. 5. Гистологические эффекты применения карбоната лития
Примечания: А – Доза 5 мг/кг. Нервные волокна больших полушарий имеют размытые контуры с фрагментами миелина. Импрегнация серебром. Увеличение × 480. Б – Доза 10 мг/кг. Гомогенизация цитоплазмы нейрона с исчезновением грануляций Ниссля, нарушением контуров ядра и цитоплазматической мембраны. Окраска толуидиновым синим по Нисслю. Увеличение × 1200. В – Доза 10 мг/кг. Неравномерная окраска миелиновых нервных волокон мозжечка. Импрегнация серебром. Увеличение × 480

белого вещества больших полушарий, мозжечка и ствола головного мозга. В одном наблюдении обнаруживались мелкоочаговые диапедезные кровоизлияния в коре больших полушарий. Наблюдался выраженный полиморфизм структурных нарушений нейроцитов. Токсическое повреждение нейроцитов преобладало над ишемическим. Каждый четвёртый нейрон коры больших полушарий оказался погибшим, что выражалось острым набуханием пирамидных клеток, гомогенизацией цитоплазмы с исчезновением грануляций Ниссля, нарушением контуров ядра с последующим глыбчатым распадом (рис. 5Б). Состояние проводящей системы головного мозга характеризовалось очаговым набуханием миелиновых волокон с неравномерным распределением миелина, что при импрегнации серебром создавало картину нечётких контуров (рис. 5В).

При использовании аскорбата лития (5 мг/кг) в условиях экспериментального сахарного диабета расстройства кровообращения нервной ткани характеризовались диффузно-очаговым гемостазом в капиллярах, полнокровием интрацеребральных и пиальных вен, умеренно выраженным перикапиллярным отёком нервной ткани коры и белого вещества больших полушарий, мозжечка и ствола головного мозга. Микроскопический анализ структурных изменений нейроцитов показал выравнивания соот-

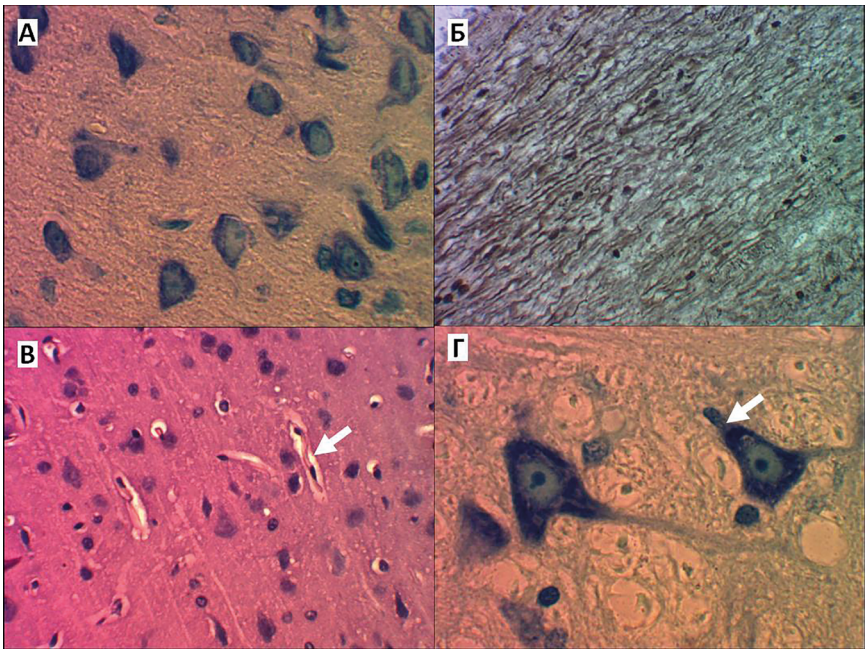


Рис. 6. Гистологические эффекты применения аскорбата лития
Примечания: А – Доза 5 мг/кг. Большинство пирамидных нейронов коры больших полушарий имеют обратимые повреждения в виде очагового хроматолиза цитоплазмы, набухания ядра с сохранившимися ядрышками. Окраска толуидиновым синим по Нисслю. Увеличение × 1200. Б – Контуры нервных волокон мозжечка чёткие с очаговой фрагментацией миелиновой оболочки. Импрегнация серебром. Увеличение × 480. В – Доза 10 мг/кг. Стаз эритроцитов в капилляре, слабовыраженный перикапиллярный отёк белого вещества большого полушария. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение × 1200. Г – Доза 10 мг/кг. Очаговое слияние глыбок Ниссля в цитоплазме пирамидных нейронов. Окраска толуидиновым синим по Нисслю. Увеличение × 1200

ношения форм токсического и ишемического повреждения клеток. Значительная часть нейроцитов коры больших полушарий и ствола головного мозга имела обратимые изменения, которые выражались очаговым хроматолизом, умеренно выраженным набуханием ядра и аксонального отростка (рис. 6А). Импрегнация проводящих путей головного мозга серебром в большинстве наблюдений показала повреждение миелиновых оболочек нервных волокон, которое характеризовалось локальной фрагментацией миелина на протяжении нервного волокна (рис. 6Б).

При использовании аскорбата лития в дозе 10 мг/кг расстройства кровообращения определялись лишь на уровне микроциркуляторного русла головного мозга в форме стаза эритроцитов в капиллярах и слабовыраженного перикапиллярного отёка нервной ткани (рис. 6В). При сбалансированности морфогенетических вариантов повреждения нейроцитов необратимые изменения затрагивали сравнительно меньшее число клеток. Большая часть повреждённых нейронов характеризовалась обратимыми изменениями в виде диффузно-очагового хроматолиза и набухания цитоплазмы, либо очаговым слиянием глыбок Ниссля, при сохранении целостности ядра и внутриядерных структур (рис. 6Г). Исследование импрегнированных серебром миелиновых нервных волокон показало наличие единичных участков демиелинизации при сохранении чётких окрашенных контуров.

Таким образом, гистологически со стороны ЦНС аллоксановый сахарный диабет у крыс характеризовался расстройством мозгового кровообращения, повреждением нейроцитов, демиелинизацией нервных волокон головного мозга. Карбонат лития не обеспечивал значимых позитивных изменений в интрацеребральном сосудистом русле. Морфометрический анализ показал, что применение аскорбата лития в дозе 5 мг/кг, и в особенности, в дозе 10 мг/кг минимизировало уровень токсического повреждения нейроцитов с увеличением количества клеток с обратимыми изменениями, а также неповреждённых нейронов (табл. 2).

Таблица 2

Результаты морфометрического анализа гистологии головного мозга (%)

Группа	Неповреждённые нейроны	Обратимые изменения нейронов	Необратимые изменения нейронов
1-я группа (контроль)	24,4	44,1	31,5
2-я группа (карбонат Li 5 мг/кг)	19,6	55,1	25,3
3-я группа (карбонат Li 10 мг/кг)	16,9	56,8	26,3
4-я группа (аскорбат Li 5 мг/кг)	27,9	48,3	23,8
5-я группа (аскорбат Li 10 мг/кг)	28,3	49,6	22,1

Среди погибших нейронов преобладали клетки, повреждения которых носили ишемический характер. Структурные изменения нервных волокон головного мозга в 4-й и 5-й группах наблюдений оказались минимальными в отличие от выраженной демиелинизации проводящих путей в 1-й (контрольной) группе.

В целом, полученные данные биохимического и гистологического исследований свидетельствуют о благоприятном влиянии аскорбата лития на течение экспериментального аллоксанового сахарного диабета у крыс. Это проявляется в уменьшении уровня гликемии, меньшем повреждении мембран, уменьшении выраженности поражений головного мозга и нервных волокон, а также снижении летальности животных. Данные результаты можно объяснить благоприятным влиянием сочетания ионов лития с аскорбат-ионом на обмен глюкозы, состояние бета-клеток и секрецию инсулина, уменьшением интенсивности ПОЛ (что во многом связано с антиоксидантной активностью аскорбата), нейропротекторной и нейротрофической активностью ионов лития (так, литий повышает уровень нейротрофических факторов и активирует путь Wnt, стимулирующий рост и регенерацию различных клеток, в т. ч. нейронов).

Заключение

Проведено сравнительное исследование эффектов неорганической соли лития (карбоната лития) и органической соли лития (аскорбат лития) на модели аллоксанового сахарного диабета. Использованная модель диабета имела морфологическое подтверждение во всех случаях наблюдений и гистологически характеризовалась расстройством кровообращения, повреждением нейроцитов, демиелинизацией нервных волокон головного мозга. Применение аскорбата лития в течение месяца при экспериментальном аллоксановом сахарном диабете облегчает его течение – повышается выживаемость животных, снижается уровень гликемии (особенно при введении в дозе 10 мг/кг). Аскорбат лития оказывает влияние на характер и степень расстройства кровообращения в нервной ткани и характеризуется снижением уровня проницаемости сосудов микроциркуляторного русла. Морфометрический анализ показал, что аскорбат лития при аллоксановом диабете оказывает нейропротекторное действие, что проявляется в уменьшении токсического повреждения нейроцитов с увеличением количества клеток с обратимыми изменениями и неповреждённых нейронов, а также минимизации структурных изменений нервных волокон. При использовании аскорбата лития в дозе 10 мг/кг показатель сохранности нейроцитов оказался незначительно выше в сравнении с 4-й группой, где дозировка аскорбата лития была 5 мг/кг. В то же время, карбонат лития в дозах 5 и

10 мг/кг не оказал значимого благоприятного воздействия ни на уровень гликемии, ни на выживаемость, ни на уровень повреждения нейроцитов и нервных волокон.

Таким образом, аскорбат лития перспективен с точки зрения проведения исследований с целью выявления возможностей его применения в комплексном лечении сахарного диабета, в том числе нарушений мозгового кровотока и диабетической нейропатии.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ

Конфликт интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Участие авторов. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Назаренко Ольга Анатольевна
ORCID ID: 0000-0002-2446-6089
к. м. н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России, Иваново, Россия

Демидов Вадим Игоревич
ORCID ID: 0000-0002-1064-8201
к. м. н., доцент, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России, Иваново, Россия

Громова Ольга Алексеевна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: unesco.gromova@gmail.com
ORCID ID: 0000-0002-7663-710X
SPIN-код: 6317-9833
д. м. н, профессор, в. н. с., научный руководитель Института фармакоинформатики при ФИЦ ИУ РАН, Москва, Россия; ЦХАБД НОЦ ЦЭ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Алексахина Елена Львовна
ORCID ID: 0000-0001-5265-6974
SPIN-код: 2568-6370
к. х. н., доцент кафедры химии, физики, математики ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России, Иваново, Россия

Торшин Иван Юрьевич
ORCID ID 0000-0002-2659-7998
SPIN-код: 1375-1114
к. х. н., с. н. с. ФИЦ ИУ РАН, Москва, Россия; ЦХАБД НОЦ ЦЭ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Nazarenko Olga A.
ORCID ID: 0000-0002-2446-6089
PhD in Medicine, associate Professor of the Department of Pharmacology FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russia

Demidov Vadim I.
ORCID ID: 0000-0002-1064-8201
PhD in Medicine, associate Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russia

Gromova Olga A.
Corresponding author
e-mail: unesco.gromova@gmail.com
ORCID ID: 0000-0002-7663-710X
SPIN code: 6317-9833
Dr. Sci. (Med.), Professor FRC CSC RAS, Moscow, Russia; Big Data Storage and Analysis Center Lomonosov MSU, Moscow, Russia

Aleksakhina Elena L.
ORCID ID: 0000-0001-5265-6974
SPIN code: 2568-6370
Candidate of Chemical Sciences, associate Professor of the Department of Chemistry, Physics, Mathematics FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russia

Torshin Ivan Yu.
ORCID ID 0000-0002-2659-7998
SPIN code: 1375-1114
Candidate of Chemical Sciences, Senior researcher FRC CSC RAS, Moscow, Russia;
Big Data Storage and Analysis Center Lomonosov MSU, Moscow, Russia

Литература / References

1. ВОЗ. Глобальный доклад по диабету. [Электронный ресурс]. [WHO. Global report on diabetes. [Electronic resource]. (In Russ).] Доступно по: http://www.who.int/diabetes/global-report/ru/ Ссылка активна на 23.12.2020.

2. Siddiqui K, Bawazeer N, Joy SS. Variation in macro and trace elements in progression of type 2 diabetes. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:461591. DOI: 10.1155/2014/461591.

3. Squassina A, Costa M, Congiu D et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) expression is up-regulated in lymphoblastoid cell lines of lithium responsive bipolar disorder patients. *Pharmacol Res*. 2013 Jul;73:1–7. DOI: 10.1016/j.phrs.2013.04.004.

4. Zawalich WS, Zawalich KC, Rasmussen H. Interactions between lithium, inositol and mono-oleoylglycerol in the regulation of insulin secretion from isolated perfused rat islets. *Biochem J*. 1989;262(2):557–561. DOI: 10.1042/bj2620557.

5. Diaz-Sastre C, Perez-Rodriguez MM, Cebollada A et al. Cholesterol and lithium levels were correlated but serum HDL and total cholesterol levels were not associated with current mood state in bipolar patients. *J Clin Psychiatry*. 2005;66(3):399-400. DOI: 10.4088/jcp.v66n0318i.

6. Lijnen P, Bex M, Bouillon R et al. Erythrocyte sodium-lithium countertransport in insulin-dependent diabetics: correlation with membrane lipids, prorenin and micro-albuminuria. *J Hypertens Suppl*. 1993;11(5):S258–259.

7. Zawalich WS, Zawalich KC, Rasmussen H. Interactions between lithium, inositol and mono-oleoylglycerol in the regulation of insulin secretion from isolated perifused rat islets. *Biochem J*. 1989;262(2):557–561. DOI: 10.1042/bj2620557.

8. Macko AR, Beneze AN, Teachey MK, Henriksen EJ. Roles of insulin signalling and p38 MAPK in the activation by lithium of glucose transport in insulin-resistant rat skeletal muscle. *Arch Physiol Biochem*. 2008;114(5):331–339. DOI: 10.1080/13813450802536067.

9. Cimarosti H, Rodnight R, Tavares A et al. An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Lett*. 2001;315(1-2):33–36. DOI: 10.1016/s0304-3940(01)02310-2.

10. Гоголева И.В. Влияние органических солей лития, магния, селена на элементный гомеостаз головного мозга на фоне экспериментальной хронической окклюзии общих сонных артерий: Автореф. дис… канд. мед. наук. — Москва; 2009. [Gogoleva IV. Vliyanie organicheskih solej litiya, magniya, selena na elementnyj gomeostaz golovnogo mozga na fone eksperimental'noj hronicheskoj okklyuzii obshchih sonnyh arterij. [dissertation] Moscow; 2009. (In Russ).] Доступно по: https://www.dissercat.com/content/vliyanie-organicheskikh-solei-litiya-magniya-selena-na-elementnyi-gomeostaz-golovnogo-mozga- Ссылка активна на 23.12.2020.

11. Sinha D, Wang Z, Ruchalski KL et al. Lithium activates the Wnt and phosphatidylinositol 3-kinase Akt signaling pathways to promote cell survival in the absence of soluble survival factors. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288(4):F703–13. DOI: 10.1152/ajprenal.00189.2004.

12. Ребров В.Г. Витамины, макро- и микроэлементы / Ребров В.Г., Громова О.А. – М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008. 960 с. [Rebrov VG. Vitaminy, makro- i mikroelementy / Rebrov VG, Gromova OA. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. (In Russ).] ISBN 978-5-9704-0814-8.

Исследование иммунотоксичности пролонгированной формы препарата Афобазол

Коваленко Л. П., Журиков Р. В., Коржова К. В., Дурнев А. Д.

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

Аннотация. Проведено исследование иммунотоксичности пролонгированной формы препарата Афобазол на самцах мышей линий СВА, C57BL/6, гибридах F1(CBA×C57BL/6). При оценке иммунотоксического действия Афобазол вводили мышам опытных групп перорально 14 дней в дозах 12 мг/кг и 120 мг/кг. Животным контрольных групп вводили плацебо таблетированной формы препарата. При оценке иммунотоксичности пролонгированной формы препарата Афобазол было выявлено, что 14-дневное пероральное введение Афобазола в дозах 12 мг/кг и 120 мг/кг мышам-гибридам F1 (CBA×C57BL/6) не вызывало значимого влияния на массу тимуса, селезёнки и подколенных лимфатических узлов по сравнению с контрольными особями, но значимо ($p < 0,01$) увеличивало клеточность тимуса при введении препарата в дозе 12 мг/кг. Введение пролонгированной формы препарата Афобазол в дозах 12 и 120 мг/кг значимо снижало уровни спонтанной хемилюминесценции в 2,0 и 2,2 раза, а в дозе 120 мг/кг значимо ($p < 0,05$) снижало интегральный показатель хемилюминесценции S в 2,4 раза по сравнению с контрольной группой, получавшей плацебо. Курсовое введение пролонгированной лекарственной формы препарата Афобазол в дозах 12 мг/кг и 120 мг/кг не влияло на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов у мышей-гибридов F1 (CBA×C57BL/6), не вызывало значимых изменений реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) по сравнению с контрольной группой. Введение пролонгированной формы препарата Афобазол перорально 14 дней в дозах 12 мг/кг и 120 мг/кг мышам линий СВА и C57BL/6 не вызывало значимого влияния на антителообразование по сравнению с данными контрольных групп. Результаты проведённого исследования иммунотоксичности пролонгированной формы препарата Афобазол позволяют заключить, что введение Афобазола в диапазоне изученных доз не оказывает иммунотоксического действия.

Ключевые слова: пролонгированная форма; Афобазол; фагоцитоз; хемилюминесценция; гуморальный иммунный ответ; клеточный иммунный ответ; иммунотоксичность

Для цитирования:
Коваленко Л.П., Журиков Р.В., Коржова К.В., Дурнев А.Д. Исследование иммунотоксичности пролонгированной формы препарата Афобазол // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2020. – № 3. – С. 48–51. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-3-48-51

Evaluation of immunotoxicity of the extended-release form of Afobazol

Kovalenko LP, Zhurikov RV, Korzhova KV, Durnev AD

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Abstract. The research of immunotoxicity of extended-release form of Afobazol was conducted on male CBA, C57BL/6 and F1 hybrids (CBA×C57BL/6) mice. Afobazol was administered per os for 14 days in doses of 12 mg/kg and 120 mg/kg. Control group received a placebo. Weight of thymus, spleen and popliteal lymph nodes was not affected by the extended-release form of Afobazol in doses of 12 mg/kg and 120 mg/kg in F1 hybrids (CBA×C57BL/6) mice compared to the control group ($p > 0.05$). Cellularity of thymus was significantly increased by the extended-release form of Afobazol in dose of 12 mg/kg ($p < 0.01$ vs control group). Administration of the extended-release form of Afobazol in doses of 12 mg/kg and 120 mg/kg decreased spontaneous chemiluminescence activity of peripheral blood lymphocytes in 2.0 and 2.2 times, in dose of 120 mg/kg level integral chemiluminescence response S was decreased in 2.4 times ($p < 0.05$ vs control group). Phagocytic activity of peritoneal macrophages and antibody production in F1 hybrids (CBA×C57BL/6) mice were not affected by administration of the extended-release form of Afobazol in doses of 12 mg/kg and 120 mg/kg ($p > 0.05$ vs control group). 14 days of the extended-release form of Afobazol in doses of 12 mg/kg and 120 mg/kg did not cause any significant change to intensity of delayed-type hypersensitivity reactions ($p > 0.05$ vs control group). The results of the study allow us to conclude that administration of the extended-release form Afobazol in the range of studied doses does not induce immunotoxicity.

Keywords: extended-release form; Afobazol; phagocytosis; chemiluminescence; humoral immune response; cellular immune response; immunotoxicity

For citations:
Kovalenko LP, Zhurikov RV, Korzhova KV, Durnev AD. Evaluation of immunotoxicity of the extended-release form of Afobazol. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2020;(3):48–51. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-3-48-51

Введение

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» разработана пролонгированная форма препарата Афобазол, селективного небензодиазепинового анксиолитика. Препарат обладает анксиолитическим действием с активирующим компонентом, не сопровождающимся гипноседативными эффектами (седативное действие выявляется в дозах, в 40–50 раз превышающих ED_{50} для анксиолитического действия). Действуя на сигма-1-рецепторы в нервных клетках головного мозга, Афобазол стабилизирует ГАМК/бензодиазепиновые рецепторы и восстанавливает их чувствительность к эндогенным медиаторам торможения. Афобазол также повышает биоэнергетический потенциал нейронов и оказывает нейропротекторное действие на нервные клетки. У препарата отсутствуют миорелаксантные свойства, негативное влияние на память и внимание. При применении препарата не формируется лекарственная зависимость и не развивается синдром отмены. Действие препарата реализуется преимущественно в виде сочетания анксиолитического (противотревожного) и

лёгкого стимулирующего (активирующего) эффектов. Уменьшение или устранение тревоги (озабоченность, плохие предчувствия, опасения, раздражительность), напряжённости (пугливость, плаксивость, чувство беспокойства, неспособность расслабиться, бессонница, страх), а, следовательно, соматических (мышечные, сенсорные, сердечно-сосудистые, дыхательные, желудочно-кишечные симптомы), вегетативных (сухость во рту, потливость, головокружение), когнитивных (трудности при концентрации внимания, ослабленная память) нарушений наблюдаются на 5–7 дни лечения Афобазолом. Пролонгированная форма Афобазола позволит усилить его анксиолитические свойства и терапевтическую активность. Пролонгированная форма препарата расширяет спектр использования селективного анксиолитика Афобазола, оценка иммунотоксичности является необходимым этапом доклинического исследования его безопасности [1, 2].

Целью данной работы являлось изучение иммунотоксического действия пролонгированной формы препарата Афобазол.

Материалы и методы

Исследование иммунотоксического действия пролонгированной формы препарата Афобазол выполнено на сертифицированных лабораторных животных, 150 самцах мышей линий СВА, С57BL/6, гибридах F_1(СВА×С57BL/6) массой 18–20 г, клинически здоровых особях, полученных из питомников «Столбовая» и «Андреевка».

При оценке иммунотоксичности Афобазола мышам опытных групп 14 дней перорально вводили пролонгированную форму препарата в дозах 12 мг/кг и 120 мг/кг. Животным контрольных групп вводили плацебо таблетированной формы препарата. Каждая группа включала 10 животных.

При изучении иммунотоксичности пролонгированной формы Афобазола использовали следующие методы:

- определение массы и клеточности органов иммунной системы мышей-гибридов F_1 (СВА×С57BL/6);
- оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мышей-гибридов F_1 (СВА×С57BL/6);
- оценка активности нейтрофилов в тесте хемилюминесценции на мышах-гибридах F_1 (СВА××С57BL/6);
- постановка реакции гиперчувствительности замедленного типа на мышах-гибридах F_1 (СВА××С57BL/6);
- постановка реакции гемагглютинации на мышах линии СВА и линии С57BL/6 [3, 4].

Для всех показателей иммунотоксикологических исследований с нормальным распределением проводили межгрупповые сравнения по непарному t-критерию Стьюдента. Для множественных сравнений показателей с распределением, отличающимся от нормального, применяли непараметрический критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке иммунотоксичности пролонгированной формы препарата Афобазол было выявлено, что 14-дневное пероральное введение препарата в дозах 12 мг/кг и 120 мг/кг мышам-гибридам F_1 (СВА×С57BL/6) не вызывало значимого влияния на массу тимуса, селезёнки и подколенных лимфатических узлов по сравнению с контрольными особями.

Двухнедельное пероральное введение пролонгированной формы препарата Афобазол в дозе 12 мг/кг значимо ($p < 0,01$) увеличивало клеточность тимуса в 1,2 раза по сравнению с контрольной группой, и не влияло на клеточность селезёнки и подколенных лимфатических узлов. Двухнедельное пероральное введение препарата в дозе 120 мг/кг не вызывало значимого изменения клеточности тимуса, селезёнки и подколенных лимфатических узлов.

Курсовое введение пролонгированной лекарственной формы препарата Афобазол в дозах 12 мг/кг и 120 мг/кг не влияло на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов у мышей-гибридов F_1 (СВА×С57BL/6).

Параметры хемилюминесценции нейтрофилов исследовались после 14-дневного перорального введения плацебо и исследуемого препарата в дозах 12 мг/кг и 120 мг/кг. У группы контрольных мышей, получавших плацебо, уровень спонтанной хемилюминесценции составил 67,8 ± 11,5 mV. Введение препарата Афобазол в дозах 12 мг/кг и 120 мг/кг вызывало значимое ($p < 0,05$) снижение уровня спонтанной хемилюминесценции, указанные показатели составили 33,4 ± 7,6 mV и 30,7 ± 5,5 mV, соответственно. После добавления к суспензии нейтрофилов зимозана уровень стимулированной хемилюминесценции — ΔI у контрольных животных, получавших плацебо, составил 159,5 ± 48,1 mV. Интегральный показатель хемилюминесценции у контрольной группы, получавшей плацебо, показатель S составил 16,3 ± 3,6 ед.×10^4. При изучении кинетики хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на зимозан в контрольной и опытных группах животных выявлено, что 14-дневное введение препарата Афобазол в дозе 12 мг/кг не приводило к значимому изменению показателей в тесте, а в дозе 120 мг/кг значимо ($p < 0,05$) снижало интегральный показатель хемилюминесценции S в 2,4 раза (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о наличии антирадикальной активности у пролонгированной формы Афобазола. Таким образом, двухнедельное пероральное введение пролонгированной лекарственной формы препарата Афобазол в дозах 12 и 120 мг/кг значимо снижало уровни спонтаной хемилюминесценции в 2,0 и 2,2 раза по сравнению с контрольной группой, получав-

Таблица 1

Влияние пролонгированной лекарственной формы препарата Афобазол на показатели хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на зимозан при пероральном введении в течение 14 дней

Table 1

Effect of the prolonged dosage form of the drug Afobazol on the parameters of the chemiluminescent response of neutrophils to zymosan when administered orally for 14 days

Группы, $n = 10$	ΔI, (mv)	Уровень значимости	S, (ед.) / 10^4	Уровень значимости
Плацебо (перорально)	159,5±48,1	—	16,3±3,6	—
Афобазол, 12 мг/кг (перорально)	113,8±25,5	$p > 0,05$	15,7±5,5	$p > 0,05$
Афобазол, 120 мг/кг (перорально)	66,9±14,6	$p > 0,05$	6,7±1,2	$p < 0,05$

Примечания: *n* – число животных; ΔI – показатель уровня активированной хемилюминесценции; S – интегральный показатель хемилюминесценции; *p* – статистическая значимость различий по сравнению с контрольной группой по непарному t-критерию Стьюдента.
Notes: *n* – number of animals; ΔI – indicator of the level of activated chemiluminescence; S – integral indicator of chemiluminescence; *p* – statistical significance of differences in comparison with the control group according to the unpaired Student's t-test.

шей плацебо. Введение пролонгированной формы Афобазола в дозе 12 мг/кг не оказывало достоверного влияния на параметры хемилюминесценции полиморфноядерных гранулоцитов, активированных опсонизированным зимозаном, а в дозе 120 мг/кг значимо ($p < 0,05$) снижало интегральный показатель хемилюминесценции S в 2,4 раза.

Введение пролонгированной формы препарата Афобазол перорально 14 дней в дозах 12 мг/кг и 120 мг/кг мышам линий СВА и С57BL/6 не вызывало значимого влияния на антителообразование по сравнению с данными контрольных групп.

Двухнедельное введение пролонгированной формы препарата Афобазол перорально в дозах 12 мг/кг и 120 мг/кг мышам гибридам F_1 (СВА×С57BL/6) в течение 14 дней не вызывало значимых изменений реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, результаты проведённого исследования иммунотоксичности пролонгированной формы препарата Афобазол позволяют заключить, что введение пролонгированной формы препарата Афобазол в диапазоне изученных доз не оказывает иммунотоксического действия.

Заключение

Результаты проведённого комплексного исследования позволяют заключить, что пролонгированная форма препарата Афобазол в диапазоне изученных доз не оказывает иммунотоксического действия. Проведённое исследование не установило данных, препятствующих клиническому испытанию готовой пролонгированой формы препарата Афобазол.

Исследование выполнено в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Коваленко Лариса Петровна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: kovalenko.larisa@mail.ru
ORCID ID: 0000-0002-2083-0832
SPIN-код: 5185-4250
д. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kovalenko Larisa P.
Corresponding author
e-mail: kovalenko.larisa@mail.ru
ORCID ID: 0000-0002-2083-0832
SPIN code: 5185-4250
D. Sci. in Biology, Leading Researcher of drug toxicology department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Журиков Руслан Валерьевич
ORCID ID: 0000-0003-1084-690X
SPIN-код: 6648-1794
м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Zhurikov Ruslan V.
ORCID ID: 0000-0003-1084-690X
SPIN code: 6648-1794
Junior researcher of laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Коржова Ксения Витальевна
ORCID ID: 0000-0002-8087-4976
SPIN-код: 3831-3782
м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Korzhova Ksenia V.
ORCID ID: 0000-0002-8087-4976
SPIN code: 3831-3782
Junior researcher of laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Дурнев Андрей Дмитриевич
ORCID ID: 0000-0003-0218-8580
SPIN-код: 8426-0380
д. м. н., профессор, член-корр. РАН, заведующий отделом лекарственной токсикологии, директор ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Durnev Andrei D.
ORCID ID: 0000-0003-0218-8580
SPIN code: 8426-0380
D. Sci. in Medicine, professor, RAS corresponding member of the RAS, Head of the department of drug toxicology, Director FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литература / References

1. Середенин С.Б., Воронин М.В. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2009. – Т. 72. – № 1. – Р. 3–11. [Seredenin SB, Voronin MV. Neuroreceptor mechanisms involved in the action of afobazole. *Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiia*. 2009;72(1):3–11. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2009-72-1-3-11.

2. Кадников И.А., Воронин М.В., Середенин С.Б. Влияние афобазола на активность хинонредуктазы 2 // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2013. – Т. 47. – №10. – С. 9–11. [Kadnikov IA, Voronin MV, Seredenin SB. Effect of afobazole on the activity of quinone reductase 2. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*. 2013:47(10);9–11. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2013-47-10-9-11.

3. Хаитов Р.М., Иванова А.С., Коваленко Л.П., и др. Методические рекомендации по оценке иммунотоксического действия фармакологических веществ. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К; 2012. – С. 64–79. [Haitov RM, Ivanova AS, Kovalenko LP, et al. Metodicheskie rekomendacii po ocenke immunotoksicheskogo dejstviya farmakologicheskih veshchestv. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv. Part one. / Ed by AN Mironova. Moscow: Grif i K; 2012. p. 64–79. (In Russ).].

4. Хаитов Р.М., Гущин И.С., Пинегин Б.В. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению иммунотропной активности фармакологических веществ. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К; 2012. – С. 626–656. [Haitov RM, Gushchin IS, Pinegin BV, et al. Metodicheskie rekomendacii po doklinicheskomu izucheniyu immunotropnoj aktivnosti farmakologicheskih veshchestv. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv. Part one. / Ed by AN Mironova. Moscow: Grif i K; 2012. p. 626–656. (In Russ).].

Исследование субхронической токсичности препарата Дантинорм Бэби

Сорокина А.В.[1], Алексеева С.В.[1], Мирошкина И.А.[1], Качалов К.С.[1], Захаров А.Д.[1], Алексеев И.В.[1], Лапицкая А.С.[2]

[1] – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

[2] – ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия

Аннотация. Представлены результаты исследования субхронической токсичности гомеопатического препарата Дантинорм Бэби в готовой лекарственной форме. Препарат в виде готового раствора вводили ежедневно перорально в течение одного месяца аутбредным крысам инфантам и кроликам породы шиншилла в дозе 0,3 мл/кг, соответствующей терапевтической, и 3 мл/кг, превышающей терапевтическую дозу в 10 раз. Клинико-лабораторные и патогистологические исследования, выполненные в соответствии с общепринятым протоколом, продемонстрировали отсутствие токсических эффектов гомеопатического препарата Дантинорм Бэби. Совокупность полученных данных субхронического эксперимента свидетельствует об отсутствии препятствий к клиническому исследованию препарата Дантинорм Бэби в диапазоне терапевтических дозировок.

Ключевые слова: Дантинорм Бэби; гомеопатический препарат; готовая лекарственная форма; субхроническая токсичность; крысы; кролики

Для цитирования:
Сорокина А.В., Алексеева С.В., Мирошкина И.А., Качалов К.С., Захаров А.Д., Алексеев И.В., Лапицкая А.С. Исследование субхронической токсичности препарата Дантинорм Бэби // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2020. – № 3. – С. 52–60. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-3-52-60

Study the subchronic toxicity of the drug Dantinorm Baby

Sorokina AV[1], Alekseeva SV[1], Miroshkina IA[1], Kachalov KS[1], Zaharov AD[1], Alekseev IV[1], Lapizkaya AS[2]

[1] – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

[2] – Gabricheysky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Abstract. Presents results of a study of subchronic toxicity of homeopathic drug Dantinorm Baby in finished dosage form. The drug in the form of a ready solution was administered daily orally for one month to outbred rats Infanta and chinchilla rabbits at a dose of 0.3 ml/kg, corresponding to the therapeutic, and 3 ml/kg, exceeding the therapeutic dose 10 times. Clinical, laboratory and histopathological studies performed in accordance with the General Protocol, showed no toxic effects of homeopathic preparation of Dantinorm Baby. The totality of the obtained data of the subchronic experiment indicates that there are no obstacles to the clinical study of the drug Dantinorm Baby in the range of therapeutic dosages.

Keywords: Dantinorm Baby; homeopathic medicine; finished dosage form; subchronic toxicity; rats; rabbits

For citations:
Sorokina AV, Alekseeva SV, Miroshkina IA, Kachalov KS, Zaharov AD, Alekseev IV, Lapizkaya AS. Study the subchronic toxicity of the drug Dantinorm Baby. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2020;(3):52–60. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-3-52-60

Введение

Фармакотерапия патологических состояний при прорезывании молочных зубов у детей младенческого возраста остаётся важнейшей задачей для педиатрической практики [1]. Патологические симптомы дентации наблюдаются у 40–70 % младенцев. Эти реакции зачастую сходны с проявлениями острой респираторной инфекции и острой кишечной инфекции [2]. Терапия таких состояний лидокаин-содержащими дентальными гелями из-за риска осложнений представляется нежелательной для развивающегося организма младенцев [2].

Комплексный препарат Дантинорм Бэби в жидкой лекарственной форме, созданный на основе растительных субстанций, обладает пролонгированным воздействием [3]. Дантинорм Бэби облегчает основные болезненные симптомы, возникающие у детей при прорезывании зубов: воспаление десен, повышенная температура, ринорея, нарушение пищеварения и плаксивость [1, 2].

Оценка субхронической токсичности является обязательным этапом доклинического изучения безопасности готовой лекарственной формы препарата Дантинорм Бэби.

Цель исследования

Целью данной работы стало изучение субхронической токсичности препарата Дантинорм Бэби.

Задачами настоящей работы стали выявление возможных токсических эффектов и поиск органов-мишеней токсического действия препарата Дантинорм Бэби при его ежедневном пероральном введении в течение одного месяца аутбредным крысам инфантам и кроликам породы шиншилла в дозе 0,3 мл/кг (соответствует терапевтической дозе) и 3 мл/кг (превышает терапевтическую дозу в 10 раз). Необходимо было установить, обратимыми ли будут последствия применения препарата Дантинорм Бэби. Важно также

было оценить степень местнораздражающего действия при пероральном введении готовой лекарственной формы препарата.

Материалы и методы

При проведении исследования использовали жидкую лекарственную форму препарата Дантинорм Бэби, серия № 15107. Препарат представляет собой смесь Chamomilla vulgaris – С9, Phitollaca decandra – С5, Reum officinale – С5 в равных долях (по 333,3 мг каждого компонента) с добавлением очищенной воды до 1 мл. Готовая лекарственная форма упакована в полиэтиленовые контейнеры ёмкостью 1 мл. Спаянные между собой 5 контейнеров были упакованы в пакет-саше из полиэтилена и алюминиевой фольги. Препарат, заявленный производителем как гомеопатический, был предоставлен Лабораторией БУАРОН, которая гарантировала его качество и подлинность.

Для исследования были отобраны аутбредные крысы инфанты начальной массой 50–60 г и кролики породы шиншилла начальной массой 2–2,5 кг, как виды, общепринятые для доклинических исследований безопасности лекарств-кандидатов и доказавшие свою релевантность в таких исследованиях. Все экспериментальные животные были получены из сертифицированных питомников (питомник Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и питомник «Белый мох»). Крысы и кролики содержались в условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в соответствии с ГОСТ 33044–2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Эксперименты с использованием крыс и кроликов были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными [4]. За основу также были взяты стандартные операционные процедуры, принятые в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», находящиеся в полном соответствии с правилами Европейской Конвенции ETS 123.

В результате двухнедельной акклиматизации и последующей рандомизации из 80 крыс инфантов обоего пола в эксперимент было отобрано 60 животных; из 40 кроликов обоего пола было отобрано 36 животных.

Дантинорм Бэби в виде готового раствора вводили крысам внутрижелудочно с использованием атравматичного металлического зонда и кроликам перорально — с помощью шприца-дозатора.

Введение осуществляли ежедневно, в течение одного месяца в дозе, соответствующей терапевтической — 0,3 мл/кг (2-я группа крыс и 2-я группа кроликов), и дозе, превышающей терапевтическую в десять раз — 3 мл/кг (3- и 4-я группы крыс и 3-я группа кроликов). Животным контрольной группы (1-я группа крыс и 1-я группа кроликов) вводили дистиллированную воду перорально в тех же объёмах, что и при оценке максимальной (субтоксической) дозы.

Объём и продолжительность исследования, набор использованных методов, регистрируемых параметров и другие условия проведения исследования регламентировались соответствующими Руководствами [5–8]. Забор биоматериала и его исследование выполнялось до начала эксперимента, через 24 часа (для крыс и кроликов всех групп, кроме 4-й группы крыс) и через две недели (только для крыс 4-й «отставленной» группы) после заключительного введения препарата.

Массу экспериментальных животных определяли еженедельно с помощью электронных весов SPU 601 (OHAUSCorp., США).

Изучение поведенческих реакций у крыс проводили по тесту «Открытое поле». Оценивали следующие характеристики: ориентировочно-исследовательские реакции (локомоторная или горизонтально-двигательная активность), количество пересечённых периферических секторов, вертикальная двигательная активность (количество вертикальных стоек), исследовательская активность «норковый рефлекс», а также эмоциональное состояние животных (количество фекальных болюсов, число уринаций, груминговая активность, выходы в центр, время замирания).

Электрокардиографическое исследование проводили у крыс с использованием беспроводной системы Физиобелт (Нейроботикс, Россия) во втором стандартном отведении. Данные анализировали с использованием программного обеспечения LabChart (Австралия). На нефиксированное животное надевали жилетку с беспроводным усилителем и электродами.

Неинвазивное измерение артериального давления у крыс проводили с использованием модулей аппаратного комплекса ADInstruments и программного обеспечения LabChart (Австралия). На хвост бодрствующей крысы надевалась манжета с преобразователем пульса, по которой можно было определить артериальное давление, основываясь на периодичности окклюзии крови в хвосте. Функцию сердечно сосудистой системы оценивали по следующим показателям: САД (систолическое артериальное давление), ДАД (диастолическое артериальное давление), среднее артериальное давление и пульс.

Измерения ректальной температуры у крыс осуществляли с использованием ректального датчика на оборудовании производства компании AD Instruments Ltd (Австралия).

Влияние препарата Дантинорм Бэби на систему крови было оценено по следующим гематологическим показателям периферической крови: количеству гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гематокриту, тромбокриту, среднему объёму эритроцитов, среднему содержанию гемоглобина в эритроцитах, средней концентрации гемоглобина в эритроците [9]. Подсчёт форменных элементов крови и гемоглобина у крыс проводили на автоматическом гематологическом анализаторе «Abacus junior vet», Австрия. Подсчёт форменных элементов крови и гемоглобина у кроли-

ков проводили на автоматическом гематологическом анализаторе BC-2800, производитель «MINDRAY», Германия. Количество ретикулоцитов подсчитано на мазках (окраска во влажной камере, микроскоп «Nikon Eclipse E200», Япония). Соотношение различных видов лейкоцитов (окраска мазков крови по Романовскому) и морфометрические параметры эритроцитов были проанализированы на компьютеризированной микроскопической системе МЕКОС-Ц1. Для стандартизации процесса приготовления мазков крови использовали автоматическое устройство для приготовления мазков крови V-SAMPLER (Австрия). Препараты крови фиксировали и окрашивали автоматически на приборе-автомате ЭМКОСТЕЙНЕР-АВТО, АФОМК8-В-01, производитель Россия.

Исследование гемостаза у крыс и кроликов проводили с использованием коагулометра TS 4000 (США). Определяли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ), протромбиновое время (ПВ), количество фибриногена.

Биохимические исследования крови у крыс и кроликов осуществляли с помощью автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора «ChemWell 2910 Combi» (США). Определяли содержание глюкозы, общего белка, альбумина, креатинина, мочевины, активность аланин- и аспартатаминотрансферазы.

Биохимические исследования мочи у крыс проводили с помощью анализатора мочи «HandUReader» (Венгрия) и автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора «ChemWell 2910 Combi», США, используя наборы реагентов для диагностики «*in vitro*» производства компании «SPINREACTS.A.» (Испания). Определяли удельный вес, кислотность, содержание глюкозы, белка.

Через 24 часа после заключительного введения препарата Дантинорм Бэби (крысы 2- и 3-й групп и кролики 2- и 3-й групп)/дистиллированной воды (крысы 1-й группы и кролики 1-й группы) всех животных подвергали патологоанатомическому вскрытию. Крыс «отставленной» группы (4-я группа) вскрывали через две недели после заключительного введения препарата. В ходе патологоанатомического вскрытия определяли массовые коэффициенты наиболее реактивных внутренних органов. Были оценены и отобраны для дальнейшего исследования фрагменты внутренних органов крыс и кроликов (сердца, лёгких, трахеи, пищевода, желудка, тонкого и толстого кишечника, печени, поджелудочной железы, почек, мочевого пузыря, надпочечников, щитовидной железы, паращитовидной железы, тимуса, селезёнки, семенников и придатков семенников самцов, яичников и маточных труб самок). Эти фрагменты фиксировали в 10 % забуференном растворе формалина. Головной мозг крыс забирали целиком и фиксировали его в 96 % этаноле [10]. После окончания фиксации фрагменты органов промывали в проточной водопроводной воде. Затем из отобранных фрагментов иссекали более тонкие участки тканей и осуществляли их гистологическую проводку по стандартному протоколу (автоматизированный тканевой процессор Leica TP1020, Германия). Обезвоженные и пропитанные парафином образцы тканей заливали в готовые стандартные блоки (система заливки тканей с графическим дисплеем Tissue-Tek®TEK™, США). Гистологические срезы толщиной 5 мкм, приготовленные с помощью ротационного микротома (Accu-Cut®SPM™, США), помещали на стекло с полилизиновым покрытием (Menzel). Окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами с последующей докраской 1 % водным раствором эозина [11, 12]. Залитые в монтирующую среду и подсушенные гистологические препараты микроскопировали в проходящем свете (микроскоп Nikon Eclipse 55i).

Возможное местное раздражающее действие препарата Дантинорм Бэби при пероральном введении оценивали клинически (ежедневные осмотры животных), затем макроскопически при проведении патологоанатомического вскрытия и микроскопически при исследовании гистологических препаратов пищевода, желудка, тонкой и толстой кишки.

Статистический анализ полученных данных проводили следующим образом. Нормальность распределения определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. В случае нормального или близкого к нему распределения для определения значимости изменений использовали t-критерий Стьюдента, однофакторный дисперсионный анализ (в случае множественных сравнений) с последующей обработкой с помощью критерия Даннета. Полученные результаты описывали с помощью средних арифметических и их стандартных ошибок. В случае значительного отклонения распределения от нормального использовали непараметрические методы статистики: критерий Манна–Уитни, аналог дисперсионного анализа по Краскеллу–Уоллису с последующей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Полученные результаты описывали с помощью медиан, нижнего и верхнего квартилей.

Статистическую значимость различий качественных признаков определяли с помощью метода точной вероятности Фишера с учётом множественных сравнений.

Результаты считались статистически значимыми, если значение p оказывалось меньшим или равным 0,05 [13, 14].

Результаты и обсуждение

При пероральном введении препарата Дантинорм Бэби в течение одного месяца в дозах 0,3 и 3 мл/кг крысам инфантам и кроликам их внешний вид и поведение не отличались от соответствующих характеристик контрольных животных, получавших перорально дистиллированную воду. Состояние шерстного покрова, кожи и видимых слизистых оболочек, а также реакция

на внешние раздражители соответствовали норме. В ходе эксперимента не погибло ни одно животное.

Дантинорм Бэби при ежедневном введении крысам в течение одного месяца в дозах 0,3 и 3 мл/кг не вызывал выраженных изменений ориентировочно-исследовательской активности и эмоциональной реакции экспериментальных животных в тесте «открытое поле».

Наблюдение за динамикой массы тела контрольных и опытных крыс инфантов выявило независимое от введения препарата, закономерное для активно растущих животных увеличение массы тела и скорости её прироста как у контрольных, так и у опытных животных. Анализ данных по динамике массы тела кроликов также не выявил эффектов, которые могли бы быть обусловлены токсическим действием препарата Дантинорм Бэби.

Еженедельные наблюдения за потреблением корма и воды опытными крысами инфантами, которым перорально вводили Дантинорм Бэби в дозах 0,3 и 3 мл/кг, не показали закономерных различий с контролем.

Фоновое исследование ЭКГ крыс инфантов во втором стандартном отведении показало, что у всех животных в начале эксперимента был нормальный синусовый ритм сокращений сердца (350–450 уд/мин.). Изучение ЭКГ, проведённое по окончании эксперимента, позволило заключить, что Дантинорм Бэби в исследованных дозах (0,3 мл/кг и 3 мл/кг) не вызывает значимых изменений электрокардиограмм у крыс экспериментальных групп по сравнению с контролем.

Изучение артериального давления у крыс инфантов контрольной и опытных групп продемонстрировало, что все исследуемые показатели находились в пределах референтных значений [15]. Сравнительный анализ полученных данных не выявил значимых различий между контрольной и опытными группами. Исключение составило незначительное снижение диастолического давления у крыс «отставленной» группы, исследованных через две недели после отмены Дантинорм Бэби в дозе 3 мл/кг (в среднем на 16,5 % по сравнению с контролем). Выявленное различие может трактоваться как нормальная вариабельность в границах физиологической нормы (табл. 1).

Исследование ректальной температуры крыс контрольной и опытных групп, проведённое на заключительном этапе эксперимента, показало, что у всех животных данный показатель находился в пределах физиологической нормы.

При изучении периферической крови крыс инфантов было установлено, что большинство показателей животных 2- и 3-й групп, получавших Дантинорм Бэби в дозах 0,3 и 3 мл/кг, значимо не отличается от таковых у контрольных крыс. Исследование морфометрических показателей эритроцитов также не выявило значимых различий с контролем. Исключение составило наблюдаемое у крыс (2- и 3-й групп) повышенное, по сравнению с контролем, содержание ретикулоцитов. При изучении периферической крови крыс «отставленной» 4-й группы, получавших Дантинорм Бэби в дозе 3 мл/кг, также не было зафиксировано значимых различий с контролем по большинству показателей. Однако и в

Таблица 1

Влияние препарата Дантинорм Бэби на артериальное давление крыс инфантов при пероральном введении в дозах 0,3 мл/кг и 3 мл/кг в течение месяца

Группа		Артериальное давление мм рт. ст.			
		Систолическое давление , мм рт. ст.	Диастолическое Давление, мм рт. ст.	Среднее артериальное давление, мм рт. ст.	Пульс , уд/мин
1-я гр. Контроль дист. вода	♀	129,80 (124,50÷135,40)	98,30 (87,50÷103,30)	109,47 (98,43÷113,27)	346,00 (331,00÷428,00)
	♂	127,50 (123,20÷139,20)	93,70 (85,30÷95,10)	104,67 (97,93÷109,80)	382,00 (377,00÷428,00)
2-я гр. Дантинорм Бэби 0,3 мл/кг	♀	120,70 (112,70÷129,60)	90,00 (84,40÷93,80)	101,87 (94,10÷105,03)	361,00 (333,00÷402,00)
	♂	124,70 (118,00÷138,10)	92,30 (91,90÷93,90)	104,08 (100,87÷109,53)	398,50 (392,00÷423,00)
3-я гр. Дантинорм Бэби 3 мл/кг	♀	123,30 (113,80÷126,20)	86,30 (84,00÷89,00)	97,10 (95,07÷103,90)	392,00 (372,00÷408,00)
	♂	121,65 (120,40÷124,30)	89,25 (87,10÷89,90)	99,43 (98,20÷100,43)	410,00 (397,00÷413,00)
4-я гр. «отстав.» Дантинорм Бэби 3 мл/кг	♀	121,50 (116,40÷132,10)	82,50* (77,50÷84,70)	94,10 (92,17÷100,93)	372,00 (357,00÷422,00)
	♂	127,20 (123,70÷129,20)	77,40* (73,60÷81,50)	92,87 (91,40÷97,40)	384,00 (352,00÷425,00)

Примечание: * – статистически значимые различия ($P < 0,05$) по сравнению с контролем.

Таблица 2

Влияние Дантинорм Бэби на показатели периферической крови крыс, получавших препарат в дозах 0,3 мл/кг и 3 мл/кг по сравнению с контролем

Показатель		Крысы самки				Крысы самцы			
		контроль	0,3 мл/кг	3 мл/кг	0,3 мл/кг «отстав. гр.»	контроль	0,3 мл/кг	3 мл/кг	3 мл/кг «отстав. гр»
Гемоглобин, г/л HGB		143,5 (136,5÷157,0)	164,0 (154,0÷165,0)	150,0 (136,0÷184,0)	152,0 (125,0÷173,0)	152,5 (143,5÷168,0)	154,0 (131,0÷156,50)	143,5 (143,0÷160,0)	161,0 (149,0÷175,0)
Эритроциты млн RBC		8,29 (7,58÷8,82)	8,27 (8,21÷8,95)	8,41 (7,55÷9,30)	8,10 (7,36÷9,42)	7,78 (7,64÷8,97)	8,21 (6,42÷8,29)	7,64 (7,30÷7,95)	8,31 (7,38÷8,58)
Ретикулоциты, % RET		2,0 (1,7÷2,1)	3,5* (3,2÷3,8)	3,2* (2,4÷4,3)	3,2* (2,9÷3,7)	2,1 (1,8÷2,3	3,3* (3,0÷3,9)	3,5* (3,3÷3,7)	3,1* (2,9÷4,3)
Гематокрит, % HCT		43,5 (41,4÷48,2)	49,3 (45,4÷49,9)	45,6 (42,6÷56,4)	44,5 (37,2÷51,9)	46,2 (42,6÷49,3)	45,0 (37,7÷45,8)	43,7 (42,1÷48,9)	46,6 (44,1÷49,1)
Ср. объём Э, фл. MCV		53,5 (51,0÷56,5)	58,0 (56,0÷59,0)	54,0 (53,0÷61,0)	54,0 (50,0÷56,0)	57,0 (52,5÷59,0)	55,0 (54,0÷57,0)	58,0 (56,0÷59,0)	57,0 (56,0÷59,0)
Ср. сод. Г в Э, пг MCH		17,5 (16,4÷18,7)	18,8 (18,6÷18,9)	17,9 (17,4÷20,3)	18,2 (17,0÷19,1)	19,0 (18,1÷19,4)	18,9 (18,2÷19,1)	19,4 (19,1÷20,0)	19,9 (19,4÷20,3)
Ср. конц. Г в Э, г/д MCHC		327,0 (324,5÷331,5)	332,0 (314,0÷338,0)	325,0 (321,0÷329,0)	335,0 (333,0÷341,0)	336,0 (329,5÷339,0)	342,0 (337,5÷343,0)	333,0 (326,0÷342,0)	348,0* (339,0÷358,0)
Тромбоциты, тыс. PLT		492,0 (443,5÷541,5)	510,0 (477,0÷525,0)	468,0 (398,0÷557,0)	560,0 (444,0÷584,0)	510,5 (426,5÷533,5)	526,0 (396,0÷596,5)	503,0 (432,0÷582,0)	502,0 (498,0÷571,0)
Ср. объём Тр., фл. PV		6,5 (6,4÷7,1)	6,6 (6,6÷6,9)	6,7 (6,6÷6,7)	6,8 (6,7÷6,8)	6,6 (6,3÷6,9)	6,7 (6,5÷6,9)	6,7 (6,7÷6,8)	6,7 (6,7÷7,6)
Тромбокрит, % PCT		0,3 (0,3÷0,3)	0,3 (0,3÷0,3)	0,3 (0,2÷0,3)	0,3 (0,3÷0,4)	0,3 (0,2÷0,3)	0,3 (0,2÷0,4)	0,3 (0,3÷0,3)	0,3 (0,3÷0,3)
Лейкоциты, тыс. WBC		14,56 (11,92÷21,07)	17,60 (13,68÷19,69)	14,11 (11,37÷20,01)	18,45 (17,24÷21,91)	11,08 (8,97÷15,74)	18,87 (17,01÷22,18)	15,83 (11,99÷18,01)	14,16 (11,63÷19,03)
Лейкограмма	П	0,50 (0,0÷1,0)	1,0 (0,0÷2,0)	0,0 (0,0÷2,0)	0,00 (0,0÷0,0)	0,0 (0,0÷1,0)	0,5 (0,0÷1,0)	0,0 (0,0÷1,0)	1,0 (1,0÷1,0)
	С	19,0 (14,5÷23,5)	19,0 17,0÷37,0)	18,0 (12,0÷18,0)	18,0 (11,0÷21,0)	14,0 (12,0÷16,5)	13,5 (10,5÷21,0)	19,0 (16,0÷23,0)	16,0 (14,0÷17,0)
	Э	0,5 (0,0÷,0)	1,0 (0,0÷2,0)	1,0 (0,0÷1,0)	0,0 (0,0÷1,0)	1,0 (0,0÷2,0)	1,0 (0,0÷2,0)	1,5 (1,0÷2,0)	2,0 (1,0÷3,0)
	Б	0,0 (0,0÷0,0)	0,0 (0,0÷0,0)	0,0 (0,0÷0,0)	0,0 (0,0÷0,0)	0,0 (0,0÷0,0)	0,0 (0,0÷0,0)	0,0 (0,0÷0,0)	0,0 (0,0÷0,0)
	М	2,5 (2,0÷3,5)	2,0 (2,0÷2,0)	0,0 (0,0÷0,0)	1,0 (1,0÷2,0)	2,5 (2,0÷3,0)	2,0 (2,0÷3,0)	2,0 (2,0÷3,0)	3,0 (2,0÷3,0)
	Л	77,5 (72,0÷81,5)	70,0 (60,0÷78,0)	79,0 (77,0÷84,0)	80,0 (77,0÷86,0)	82,0 (79,5÷82,0)	83,5 (75,0÷84,5)	75,5 (75,0÷77,0)	78,0 (77,0÷81,0)

Примечания: * – различие с контролем достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$; ÷ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) между 3- и 4-й группами.

этой группе наблюдали более высокое, чем в контроле, содержание ретикулоцитов (табл. 2). Отмечено также повышение (на 3 %) показателя средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС) по сравнению с контролем. Следует отметить, что различия в этих показателях, хотя и было статистически значимым, но находились в пределах колебаний, обычно наблюдаемых у беспородных крыс [15, 16].

Обобщённый анализ данных проведённых гематологических исследований экспериментальных кроликов не выявил эффектов, которые могли бы быть обусловлены токсическим действием препарата Дантинорм Бэби.

Установлено, что до введения Дантинорм Бэби в дозе 0,3 мл/кг показатели периферической крови кроликов, не имели значимых различий с показателями контрольной группы. За исключением несколько более низкой (11 %) средней концентрации гемоглобина в крови у самцов.

При исследовании морфометрических данных эритроцитов кроликов этой группы в начале эксперимента, не наблюдалось значимых различий с контролем в регистрируемых показателях. Установлено, что у кроликов 2-й группы к окончанию эксперимента большинство показателей периферической крови не имели значимых различий с контролем. За исключением среднего объёма эритроцитов, который у самок этой группы был значимо выше контрольного на 13 %. По сравнению с первоначальными данными через месяц введения препарата у кроликов регистрировали те же изменения показателей красной крови, что в контроле: содержание гемоглобина и количество эритроцитов увеличилось в среднем на 23 и 15 %, соответственно. Показатель гематокрита у кроликов вырос на 12 % по сравнению с исходными данными. Отмечены некоторые изменения эритроцитарных индексов, которые хотя и были статистически значимыми, были незначительны и не выходили за границы референтных значений для данного вида животных. Снижение содержание тромбоцитов и, соответственно, доли того объёма цельной крови, который забирают на себя кровяные пластинки (тромбокрита), фиксировали только у самок. Однако изменение этих показателей не выходило за пределы физиологической нормы. При исследовании морфометрических показателей эритроцитов, проведённом через 24 часа после заключительного введения Дантинорм Бэби в дозе 0,3 мл/кг, у кроликов отмечено значимое улучшение морфологических показателей эритроцитов: увеличение содержания дискоидных клеток и, как следствие, снижение дегенеративных форм эритроцитов у кроликов обоего пола, а также уменьшение анизоцитоза и полихроматофильных эритроцитов у самок.

Установлено, что до введения Дантинорм Бэби у самок 3-й группы не отмечалось значимых различий с контролем по регистрируемым показателям периферической крови. При исследовании морфометрических данных эритроцитов в начале эксперимента, не наблюдалось значимых различий с контролем в регистрируемых показателях, за исключением значимо более высокого показателя анизохромии у самцов по сравнению с аналогичным контрольным значением. Установлено, что у кроликов 3-й группы через месяц введения Дантинорм Бэби в дозе 3 мл/кг к окончанию эксперимента показатели периферической крови не имели значительных различий с контролем. По сравнению с первоначальными данными у животных регистрировали те же изменения показателей крови, что и у кроликов 2-й группы.

При исследовании морфометрических показателей эритроцитов через месяц перорального введения препарата Дантинорм в дозе 3 мл/кг не выявлено значимых различий с контролем. По сравнению с исходными данными отмечено улучшение качественного состава эритроцитарных клеток – уменьшение анизоцитоза и количества анизохромных эритроцитов у кроликов обоего пола. В цитоархитектонике эритроцитов у самцов был зарегистрирован более высокий уровень нормальных (дискоидных) эритроцитов по сравнению с аналогичным контрольным показателем.

Исследование системы гемостаза, выполненное на крысах инфантах, позволило установить, что все показатели контрольных животных находились в пределах обычно наблюдаемых значений, за исключением укороченного значения АЧТВ у самцов. У самок крыс, получавших препарат в дозе 0,3 и 3 мл/кг, не выявлено значимых различий по сравнению с контрольными животными. В то же время у самцов, получавших препарат в дозе 3 мл/кг (3-я группа), наблюдалось значимое удлинение АЧТВ на 22,8 % и снижение концентрации фибриногена на 40,5 % («отставленная» группа) по сравнению с аналогичными показателями у контрольных крыс. Следует отметить, что изменения показателей АЧТВ и фибриногена у самцов крыс находились в пределах обычно наблюдаемых значений [16].

Исследование системы гемостаза, выполненное на кроликах, не выявило значимых различий между контрольной и опытными группами по показателям, характеризующим свёртывающую способность крови кроликов. Следует отметить, что все исследуемые показатели гемостаза животных контрольных и опытных групп находились в пределах физиологической нормы [15, 16].

При биохимическом исследовании сыворотки крови крыс инфантов установлено, что все выявленные колебания изученных показателей всех опытных групп, получавших Дантинорм Бэби, находились в пределах обычно наблюдаемых значений, характерных для этого вида животных. Так, у крыс, получавших Дантинорм Бэби в дозе 0,3 мл/кг (2-я группа), по сравнению с контролем, не было выявлено значимых различий в биохимическом составе крови. При исследовании крови крыс, получавших препарат в дозе 3 мл/кг (3-я группа), у самок было зарегистрировано значимое

повышение концентрации общего белка на 30,8 % и альбумина на 18,5 % по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе животных. У самок «отставленной» группы (4-я группа) было также отмечено значимо повышенное содержание общего белка (20,7 %) и альбумина (16,5 %) по сравнению с показателями, наблюдаемыми у контрольных животных. У самцов отставленной группы не выявлено значимых различий по сравнению с группой контроля.

При биохимическом изучении сыворотки крови кроликов контрольной и опытных групп, все исследуемые биохимические показатели находились в пределах физиологической нормы для данного вида животных.

У кроликов, получавших Дантинорм Бэби в дозе 0,3 мл/кг (2-я группа), по сравнению с контрольными животными, не установлено значимых различий в биохимическом составе крови.

У кроликов обоего пола, получавших препарат в дозе 3,0 мл/кг (3-я группа), наблюдалось значимое повышение концентрации общего белка и альбумина. У самок было установлено значимое повышение концентрации общего белка на 33,2 %, альбумина – на 53 %, а у самцов — на 43,4 % и 40,7 %, соответственно, по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе. У самок этой группы также было зарегистрировано значимое увеличение уровня глюкозы (42,7 %) и мочевины (28,7 %) и снижение содержания креатинина в 2,8 раз по сравнению с контролем.

Выявленные изменения биохимических показателей у кроликов, получавших препарат в дозе 3,0 мл/кг, находились в границах физиологической нормы для данного вида животных.

Проведённые исследования физико-химических свойств мочи крыс инфантов контрольной и опытных групп не выявили эффектов, которые могли бы трактоваться как обусловленные токсическим действием препарата Дантинорм Бэби. Все изученные показатели не отклонялись от референтных значений.

В результате патологоанатомического вскрытия, последующего статистического анализа массовых коэффициентов наиболее реактивных внутренних органов, а также макроскопического и микроскопического исследования установлено следующее.

Макроскопическая картина внутренних органов, обнаруженная при патологоанатомическом вскрытии животных всех экспериментальных групп, не отличалась от таковой у животных контрольных групп (крыс инфантов и кроликов). Следует отметить, что макроскопическая картина внутренних органов крыс «отставленной» группы, также не отличалась от наблюдаемой у животных, обследованных через 24 часа после заключительного введения препарата (2- и 3-я группы) и дистиллированной воды (1-я группа).

Микроскопическая картина всех изученных внутренних органов и головного мозга крыс инфантов, выведенных из эксперимента через 24 часа или две недели после заключительного перорального введения препарата Дантинорм Бэби в дозах 0,3 и 3 мл/кг, была аналогична таковой, наблюдаемой у крыс контрольной группы.

Изученная микроскопическая картина всех внутренних органов кроликов, выведенных из эксперимента через 24 часа после заключительного перорального введения препарата Дантинорм Бэби в дозах 0,3 и 3 мл/кг, также была аналогична наблюдаемой у кроликов контрольной группы.

При исследовании местного действия Дантинорм Бэби в дозах 0,3 и 3 мл/кг показано, что препарат не обладает раздражающим эффектом в отношении органов желудочно-кишечного тракта экспериментальных животных.

Так, при проведении манипуляции перорального введения отмечали, что все животные контрольных и экспериментальных групп вели себя одинаково спокойно, не проявляли признаков агрессии. При ежедневных осмотрах крыс и кроликов контрольной группы, а также крыс и кроликов экспериментальных групп, которым препарат Дантинорм Бэби вводили перорально в дозах 0,3 и 3 мл/кг, не было отмечено морфологических признаков раздражения слизистой оболочки ротовой полости ни у одного животного. У крыс «отставленной» группы после 14-дневного периода отмены клинических признаков местной реакции также обнаружено не было.

Патологоанатомическое вскрытие животных контрольных и экспериментальных групп не выявило у них макроскопических изменений ротовой полости, языка, глотки, пищевода, желудка, тонкого и толстого отделов кишечника. Микроскопическая картина пищевода, желудка, тонкого и толстого отделов кишечника крыс и кроликов экспериментальных групп, получавших Дантинорм Бэби в дозах 0,3 и 3 мл/кг, была идентичной таковой, наблюдаемой у контрольных крыс и кроликов, получавших дистиллированную воду.

При последующем микроскопическом изучении пищевода, желудка, тонкого и толстого отделов кишечника крыс и кроликов установлено, что микроскопическая картина органов пищеварения у животных всех экспериментальных групп, получавших Дантинорм Бэби в дозах 0,3 и 3 мл/кг, является идентичной таковой, наблюдаемой у контрольных животных.

Заключение

Клинико-лабораторные и патогистологические исследования, выполненные в соответствии с общепринятым протоколом [4–8], продемонстрировали отсутствие токсических эффектов гомеопатического препарата Дантинорм Бэби.

В результате проведённых исследований установлено, что препарат Дантинорм Бэби, вводимый ежедневно перорально в течение одного месяца в дозах 0,3 и 3 мл/кг беспородным белым крысам и кроликам, в использованных дозах не вызывает потенциальных

нежелательных фармакодинамических эффектов на физиологические функции организма (центральную нервную систему, сердечно-сосудистую систему и дыхание).

Совокупность полученных данных свидетельствует об отсутствии препятствий к клиническому испытанию препарата Дантинорм Бэби в диапазоне терапевтических дозировок.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Сорокина Александра Валериановна
ORCID ID: 0000-0002-9600-7244
к. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Алексеева Светлана Витальевна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: alexeeva.sv@mail.ru
ORCID ID: 0000-0002-1262-6997
SPIN-код: 8985-3418
в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Мирошкина Ирина Александровна
ORCID ID: 0000-0002-3208-198X
SPIN-код: 4697-7938
н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Качалов Кирилл Сергеевич
SPIN-код: 2992-6789
инженер 1-й категории лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия; студент фармацевтического факультета Московского медицинского университета «Реавиз», Москва, Россия

Захаров Алексей Дмитриевич
SPIN-код: 9013-6228
м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Алексеев Иван Владимирович
SPIN-код: 9757-6210
инженер 1-й категории лаборатории фармакологии мутагенеза ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия; студент фармацевтического факультета Московского медицинского университета «Реавиз», Москва, Россия

Sorokina Aleksandra V.
ORCID ID: 0000-0002-9600-7244
PhD in Biology, Leading researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Alekseeva Svetlana V.
Corresponding author
e-mail: alexeeva.sv@mail.ru
ORCID ID: 0000-0002-1262-6997
SPIN code: 8985-3418
Leading researcher of laboratory of drug toxicolog FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Miroshkina Irina A.
ORCID ID: 0000-0002-3208-198X
SPIN code: 4697-7938
Research scientist of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Kachalov Kirill S.
SPIN code: 2992-6789
Engineer of the 1st category of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia; student of the pharmaceutical faculty of the Moscow medical university «Reaviz», Moscow, Russia

Zakharov Aleksei D.
SPIN code: 9013-6228
Junior researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Alekseev Ivan V.
SPIN code: 9757-6210
Engineer of the 1st category of the Laboratory of Pharmacology of mutagenesis FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia; student of the faculty of pharmacy Moscow Medical University «Reaviz», Moscow, Russia

Лапицкая Анастасия Сергеевна
SPIN-код: 7966-8750
к. б. н., с. н. с., лаборатории диагностики и профилактики инфекционных заболеваний ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

Volkova Anna V.
PhD in Biology, Senior Research Officer of the Laboratory of Diagnostics and Prevention of MRIEM, Moscow, Russia

Литература / References

1. Казюкова Т.В., Ильенко Л.И., Котлуков В.К. Длительность и эффективность воздействия различных лекарственных средств при симптомах патологической дентации у младенцев // *Педиатрия. Журнал имени Г.Н. Сперанского.* 2019;98(2):133-140. [Kazyukova TV, Ilyenko LI, Kotlukov VK. Duration and effectiveness of exposure of various drugs for pathological teething symptoms in infants. *Pediatria. Journal named after G.N. Speransky.* 2019;98 (2):133-140. (In Russ).]

2. Казюкова Т.В., Радциг Е.Ю., Панкратов И.В., Алеев А.С. Сравнение клинической эффективности и безопасности двух лекарственных препаратов в терапии симптомов прорезывания молочных зубов у детей раннего возраста («Дантинорм Бэби®» VS «Калгель®») // *Педиатрия. Журнал имени Г.Н. Сперанского.* 2018;97(1):122-130. [Kazyukova TV, Radzig EYu, Pankratov IV, Aleev AS. Comparison of clinical efficacy and safety of the two drugs in the therapy of symptoms of eruption of infant teeth («Dantinorm Baby®» VS «Calgel®»). *Pediatria. Journal named after G.N. Speransky.* 2018;97(1):122-130. (In Russ).]

3. Казюкова Т.В., Котлуков В.К., Шевченко Н.Н., Русакова В.Д. Симптомы прорезывания зубов у младенцев: состояние или болезнь? // *Педиатрия. Журнал имени Г.Н. Сперанского.* 2013;92(4):62-63. [Kazyukova TV, Kotlukov VK, SHevchenko NN, Rusakova VD. Simptomy prorezyvaniya zubov u mladencev: sostoyanie ili bolezn? Pediatria. *Journal named after G.N. Speransky.* 2013;92(4):62-63. (In Russ).]

4. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. DOI: 10.17226/12910

5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Изучение «хронической» токсичности. – М.: Медицина; 2005, 47-54. [Guideline for Experimental (Preclinical) Studying of New Pharmacological Substances. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya farmakologicheskikh veshchestv. Izuchenie «khronicheskoi» toksichnosti. Moscow: Medicine; 2005. P. 47-54 (In Russ).]

6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. Изучение хронической токсичности. – М.: Гриф и К; 2012, С. 17- 24. [Guidance on Preclinical Evaluation of Medicines. Part 1. Metodicheskie rekomendacii po izucheniyu obshchetoksicheskogo dejstviya lekarstvennyh sredstv. Izuchenie hronicheskoj toksichnosti. Moscow: Grif i K; 2012, P. 17- 24. (In Russ).]

7. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. – М.: Гриф и К, 2013. – 328 с. [Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennyh sredstv. Tom I. Moscow: Grif i K, 2013. (In Russ).]

8. Diehl KH, Hull R, Morton D et al. A good practice guide to the administration of substances and removalof blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol.* Jan-Feb 2001;21(1):15-23. DOI: 10.1002/jat.727.

9. Исследование системы крови в клинической практике / [Козинец Г. И., Арустамян Ю. С., Ашуров Г. Д. и др.]; Под ред. Г. И. Козинца, В. А. Макарова. – М.: Триада-Х; 1997. – 480 с. [Issledovanie sistemy krovi v klinicheskoj praktike / [Kozinets GI, Arustamyan YuS, Ashurov GD et al.]; Ed by GI Kozinets, VA Makarov. Moscow: Triada-X; 1997. (In Russ).] ISBN 5-86021-006-X

10. Микроскопическая техника. Руководство для врачей и лаборантов / Под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова. – М.: Медицина; 1996. – 544 с. [Mikroskopicheskaya tekhnika. Rukovodstvo dlya vrachej i laborantov / Ed by DS Sarkisov and YuL Perov. Moscow: Medicine; 1996. (In Russ).] ISBN: 5-225-02820-9

11. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство / А.Г. Сапожников, А.Е. Доросевич; – Смоленск: САУ; 2000. – 475 с. [Histological and microscopical technique: Rukovodstvo / AG Sapozhnikov, AE Dorosevich. Smolensk: SAU; 2000. (In Russ).]

12. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. 5-е изд., испр. и доп. – Ленинград: Медицина; Ленингр. отд-ние, 1969. [Merkulov GA. Kurs patologogistologicheskoi tekhniki. Leningrad: Medicine; 1969. (In Russ).]

13. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика; 1998, – 359 с. [Glanc S. Mediko-biologicheskaya statistika Moscow: Praktika; 1998. (In Russ).]

14. Беленький М.Б. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Ленинград: Медгиз; 1963. [Belenky MB. Elementy kolichestvennoj ocenki farmakologicheskogo effekta. Leningrad: Medgiz; 1963. (In Russ).]

15. Проблемы нормы в токсикологии / Под ред. проф. И.М. Трахтенберга. – М.; Медицина; 1991. – 203 с. [Problemy normy v toksikologii / Ed by prof. IM Trahtenberga). Moscow: Medicina; 1991. (In Russ).]

16. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / Под ред. Макарова В.Г., Макаровой М.Н. – СПБ: Изд-во «ЛЕМА»; 2013. – 116 с. [Spravochnik Fiziologicheskie, biohimicheskie i biometricheskie pokazateli normy eksperimental'nyh zhivotnyh / Ed by Makarova VG, Makarovoj MN. SBP: «LEMA»; 2013, (In Russ).] ISBN 978-5-98709-619-2

УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ

«УПРАВЛЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИМИ ИССЛЕДОВАНИЯМИ» описывает методологию эффективного управления проектом по изысканию, разработке и выводу на фармацевтический рынок лекарственных средств, начиная с этапа поиска перспективных химических соединений, проведения доклинических испытаний веществ-кандидатов, клинических исследований лекарств-кандидатов, фармаконадзора, управления данными, анализа полученных данных, составления окончательного отчёта об исследовании, получения регистрационного удостоверения, публикации результатов, заканчивая организацией пострегистрационных исследований безопасности, проведением неинтервенционных и фармакоэпидемиологических исследований, а также процесс обеспечения качества, проведения аудита и инспекций уполномоченных органов здравоохранения, создания стандартных операционных процедур, архивирования документов исследования. Изложенный материал основывается на современных регулирующих требованиях законодательства Российской Федерации и государств – членов Евразийского экономического союза.

«ФАРМАКОНАДЗОР» описывает методологию фармаконадзора, организацию пострегистрационных исследований безопасности, фармакоэпидемиологических и неинтервенционных исследований, организация системы фамаконадзора в фармацевтической компании, чрезвычайные ситуации в клинических исследованиях, особенности фармаконадзора у беременных и кормящих. Изложенный материал основывается на современных регулирующих требованиях законодательства Российской Федерации и государств – членов Евразийского экономического союза.

«ВКЛЮЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОГРАНИЧИТЕЛЬНЫЕ ПЕРЕЧНИ: ПОШАГОВЫЙ АЛГОРИТМ» — это невероятно полезный и компактный ресурс по подготовке Предложения на включение в ограничительные Перечни лекарственных препаратов. После прочтения этой книги процесс включения в Перечни сложится из разрозненных пазлов в единую картину. На страницах книги авторы профессионально, шаг за шагом, подробно и доходчиво объясняют методы сбора доказательной базы, рассказывают о методологии проведения сравнительной оценки эффективности и безопасности, клинико-экономических исследований и анализа влияния на бюджет, современных рекомендациях по подготовке Предложения на включение в ограничительные Перечни. Изложенный материал основывается на современных регулирующих требованиях законодательства Российской Федерации.

«ИССЛЕДОВАНИЯ РЕАЛЬНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ» освещает правовые вопросы, методологию планирования и проведения исследований реальной клинической практики для формирования основанных на них доказательств, методы сбора данных, этическую экспертизу и статистический анализ таких исследований. Впервые в России обобщены термины и определения касаемо исследований реальной клинической практики.

Приобрести книги можно по тел. +7 (910) 449-22-73 или e-mail: eva88@list.ru
ООО «Издательство ОКИ», https://izdat-oki.ru