

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

ФАРМАКОКИНЕТИКА и ДИНАМИКА

Включен в перечень рецензируемых
научных журналов ВАК РФ



№1.2023



Главный редактор

Жердев Владимир Павлович

д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, Москва

Зам. главного редактора

Смирнов Валерий Валерьевич

д. фарм. 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

**Мирошниченко Игорь
Иванович**
д. м. н., Москва

Рудакова Алла Всеволодовна
д. фарм. н., профессор,
Санкт-Петербург

**Раменская
Галина Владиславовна**
д. фарм. н., профессор, Москва

**Сариев Абрех
Куангалиевич**

д. м. н., профессор, Москва

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

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

Сычёв Дмитрий Алексеевич
академик РАН, д. м. н.,
профессор, Москва

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

Хохлов Александр Леонидович
академик РАН, д. м. н.,
профессор, Ярославль

**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 15.04.2023 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

Оформить подписку можно через «Агентство «Книга-Сервис»
или каталог «Пресса России» — подписной индекс Е45072

Сайт журнала: www.PharmacoKinetics.ru Журнал зарегистрирован в Федеральной служ-
бе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций
(Роскомнадзор) 04.02.2021 года свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС 77-80349.
ISSN 2587-7836. Журнал включен в перечень ВАК. Авторские материалы не обязательно
отражают точку зрения редакции. Редакция не несет ответственности за достоверность ин-
формации, содержащейся в рекламных материалах.

Сайты

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru
www.ClinVest.ru
www.MyRWD.ru
www.Patient-Oriented.ru
www.PharmacoGenetics-Pharmaco-
Genomics.ru

Журналы

Антибиотики и Химиотерапия
Качественная клиническая практика
Реальная клиническая практика: данные и доказательства
Пациентоориентированная медицина и фармация
Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru
www.izdat-OKi

Центр Фармакоэкономических Исследований
Издательство ОКИ

АКТУАЛЬНЫЕ ОБЗОРЫ

Применение дисперсионного анализа в экспериментальной
фармакологии
Цорин И. Б. 3

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ И ФАРМАКОДИНАМИКИ

Изучение возможности коррекции поведенческих
нарушений у крыс со стереотаксической моделью
болезни Альцгеймера
Сёмина И. И., Малиновская Н. А., Никитин Д. О.,
Никитина А. В., Семёнова А. А. 24

Влияние ингибиторов циклооксигеназы и их комбинаций
с мексидолом при курсовом применении на поведение
половозрелых крыс
Иванова Е. А., Васильчук А. Г., Матюшкин А. И.,
Воронина Т. А. 33

Сравнительная оценка эхокардиографических и
морфометрических характеристик левого желудочка
сердца крыс
Ионова Е. О., Мирошкина И. А., Сорокина А. В.,
Крыжановский С. А. 41

Влияние дипептидного миметика 4-й петли NGF ГК-1
на рост опухоли и метастазирование эпидермоидной
карциномы лёгкого Lewis у самцов мышей линии C57BL/6
Коваленко Л. П., Журиков Р. В., Поварнина П. Ю.,
Тарасюк А. В. 45

Изучение острой токсичности ГИЖ-298 на беспородных
белых мышках при пероральном введении
Сорокина А. В., Алексеева С. В., Мирошкина И. А.,
Волкова А. В., Качалов К. С., Захаров А. Д.,
Алексеев И. В., Дурнев А. Д. 51

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

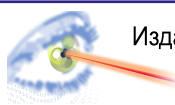
Валидация тест-системы для количественного определения
концентрации трастузумаба (Герцептин, Гертикад)
в биологических жидкостях методом твердофазного
иммуноферментного анализа
Писарев В. В., Иванов А. В. 58

ЮБИЛЕЙ

Яворский Александр Николаевич: к 75-летию со дня
рождения 65

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS

№1
2023



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

Kolyanov Gennady

Ph.D., Moscow

Mirzoyan Ruben

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

Miroshnichenko Igor

Ph.D., Moscow

Rudakova Alla

Ph.D., Professor, St. Petersburg

Ramenskaya Galina

Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek

Ph.D., Professor, Moscow

Spasov Alexander

Academician RAS, Ph.D.,
Professor, Moscow

Starodubtsev Alex

Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry

Academician RAS,
Ph.D., Professor, Moscow

Tyurenkov Ivan

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

Khokhlov Alexander

Academician RAS, Ph.D.,
Professor, Yaroslavl

ISSUING GROUP

Belousov Dmitry

Managing Editor

+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-ok.ru

Zhuk Elena

Design and layout

e-mail: elenazuk70@mail.ru

Signed in print 15.04.2023 r. **Circulation** 400 copies.

Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com

115093, Moscow, Partinnyj pereulok, 1/58, bld. 3, office 11

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiskay, 8

FSBI «ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY»

Tel./Fax: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

You can subscribe via the «Agency «Book-Service» or the catalog

«Press of Russia» — **Index E45072**

Website: www.PharmacoKinetica.ru The journal was registered with the Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor) on 02/04/2021, the certificate of registration of the mass media PI No. FS 77-80349. ISSN 2587-7836. **The journal is included in the list of Higher Attestation Commission (HAC) of Russian Federation.** Copying 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

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru

www.ClinVest.ru

www.MyRWD.ru

www.Patient-Oriented.ru

www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Journals

Antibiotics and Chemotherapy

Good Clinical Practice

Real-World Data & Evidence

Patient-Oriented Medicine and Pharmacy

Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

www.HealthEconomics.ru

www.izdat-Ok.ru

Center of Pharmacoeconomics Research
Publisher OKI

CONTENTS

REVIEWS

Application of variance analysis in experimental pharmacology
Tsorin IB 3

PRECLINICAL STUDIES OF PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS

Study of the possibility of correcting behavioral disorders
in rats with a stereotaxic model of Alzheimer's disease
*Semina II, Malinovskaya NA, Nikitin DO,
Nikitina AV, Semenova AA* 24

Effect of multiple-dose regimens of cyclooxygenase
inhibitors and their combinations with mexidol
on behavior in mature rats
*Ivanova EA, Vasilchuk AG, Matyushkin AI,
Voronina TA* 33

Comparative evaluation of echocardiographic and
morphometric characteristics of the rat heart left ventricle
*Ionova EO, Miroshkina IA, Sorokina AV,
Kryzhanovskii SA* 41

Effect of GK-1 NGF Loop 4 Dipeptide Mimetic on tumor
growth and metastasis of Lewis lung carcinoma in experiment
on male C57BL/6 mice
*Kovalenko LP, Zhurikov RV, Povarnina PYu,
Tarasiuk AV* 45

Study of acute toxicity of GlZh-298
*Sorokina AV, Alekseeva SV, Miroshkina IA,
Volkova AV, Kachalov KS, Zakharov AD,
Alekseev IV, Durnev AD* 51

PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

Validation of ELISA Test-system for Trastuzumab
(Herceptin, Hertikad) quantitative determination
in biological fluids
Pisarev VV, Ivanov AV 58

ANNIVERSARY

Yavorsky Alexander: on the 75th anniversary of his birth 65

CONTENTS

Применение дисперсионного анализа в экспериментальной фармакологии

Цорин И. Б.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Аннотация. В статье рассматриваются различные типы дисперсионного анализа: однофакторный, двухфакторный, повторных измерений, в том числе подробно разбирается дисперсионный анализ категориальных данных. Описываются критерии множественных сравнений: по Бонферрони, по Ньюмену–Кейлсу, по Даннету, по Шеффе. Все рассмотренные методы сопровождаются примерами анализа фармакологических данных.

Ключевые слова: дисперсионный анализ; множественные сравнения; количественные и категориальные данные

Для цитирования:

Цорин И. Б. Применение дисперсионного анализа в экспериментальной фармакологии. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(1):3–23. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-3-23>

Поступила: 21 февраля 2023 г. **Принята:** 26 февраля 2023 г. **Опубликована:** 24 марта 2023 г.

Application of variance analysis in experimental pharmacology

Tsorin IB

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. The article discusses various types of variance analysis: one-factor, two-factor, repeated measurements, including detailed analysis of variance categorical data. The criteria of multiple comparisons are described: according to Bonferroni, according to Newman-Kales, according to Dunnet, according to Scheffe. All the methods considered are accompanied by examples of analysis of pharmacological data.

Keywords: analysis of variance; multiple comparisons; quantitative and categorical data

For citations:

Tsorin IB. Application of variance analysis in experimental pharmacology. *Farmakokinetika i farmakodinamika* = *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(1):3–23. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-3-23>

Received: February 21, 2023. **Accepted:** February 26, 2023. **Published:** March 24, 2023.

Введение / Introduction

По своей сути фармакологические исследования это выявление эффекта воздействия на организм животного одного и более (2–3) качественных факторов, имеющих 2 и более уровней (градаций). В эксперименте, в котором изучается воздействие одного фактора в 2 градациях (т. е. проводится только одно сравнение), может быть использован *t*-критерий Стьюдента или непараметрический метод Манна–Уитни. Однако в большинстве исследований действующих факторов и их градаций бывает, как правило, больше. Очень часто при такой ситуации исследователи проводят попарное сравнение большого количества выборок с помощью методов, предназначенных для оценки различий 2 групп (наиболее часто критерий Стьюдента). Такой подход является грубой ошибкой, так как в этом случае вступает в силу эффект множественных сравнений.

Рассмотрим гипотетический пример. Исследовали влияние соединений А и В на уровень артериального давления. Эксперимент проводили на 3 группах спонтанно гипертензивных крыс: 1-я — в течение месяца получает вещество А; 2-я — вещество В; 3-я — эквивалентный объём растворителя. Статистическая обработка с помощью стандартного критерия Стьюдента показала, что в каждом из трёх сравнений $p < 0,05$, т. е. вероятность ошибки I рода (отвергнуть верную нулевую гипотезу) менее 5 %. Однако это не совсем так. В действительности, так как мы допускаем 5 % процентную ошибку в каждом из сравне-

ний, 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 одном сравнении $P' = p$). При небольшом количестве сравнений $P' \approx pk$. Следовательно, в нашем случае вероятность ошибиться хотя бы в 1 из сравнений составляет не многим менее 15 % [1].

Для анализа результатов наблюдений, зависящих от различных действующих факторов, с целью выявления наиболее значимых факторов и оценки их влияния на исследуемый процесс, в 1918 г. Рональдом Фишером (английский математик и генетик, один из основателей популяционной генетики) был разработан дисперсионный анализ (латинская аббревиатура ANOVA) [2, 3]. (В действительности критерий Стьюдента даёт такие же результаты, что и дисперсионный анализ для одного фактора с 2 градациями).

С помощью дисперсионного анализа устанавливается, какая доля общей вариации регистрируемых показателей связана с изменением градаций изучаемых факторов. Если дисперсия, связанная с действием изучаемого фактора, будет значимо отличаться от остаточной (случайной) дисперсии, то можно сделать вывод о значительном влиянии фактора на среднее значение наблюдаемой случайной величины [3, 4].

Следует отметить, что факторы можно разделить на две группы: регулируемые и нерегулируемые. Градации регулируемых факторов исследователь может

менять по своему усмотрению в процессе планирования эксперимента (например, дозы вещества, модель патологического процесса и т. д.); градации нерегулируемых факторов заданы изначально и не могут быть изменены по воле экспериментатора [4, 5]. В экспериментальной фармакологии изучают действие регулируемых факторов.

Классический дисперсионный анализ (существуют также его непараметрические аналоги) основывается на следующих допущениях: изучаемые случайные величины имеют нормальное или близкое к нему распределение; дисперсии экспериментальных данных на всех градациях изучаемых факторов гомогенны (неразличимы); изучаемые факторы (если их больше 1) независимы; выборки сформированы случайным образом (рандомизированы) [3–6].

Поэтому перед проведением дисперсионного анализа следует вначале проверить нормальность распределения изучаемых случайных величин и гомогенность дисперсий анализируемых совокупностей.

Для проверки нормальности распределения малых выборок ($n \leq 50$) может быть использован критерий Шапиро–Уилка, для анализа выборок больших размеров обычно применяют критерий Колмогорова–Смирнова. Для проверки гомогенности дисперсий наиболее универсальным является критерий Левене в модификации Брауна–Форсайта. Подробно эти методы мы разбирать в данной статье не будем, они изложены в [7] и программно разработаны в ППП «Statistika».

В зависимости от количества факторов, влияние которых на результирующий признак изучается, выделяют однофакторный и многофакторный дисперсионный анализ. В том случае, если изучается влияние факторов на более чем одну независимую переменную, характеризующую объект исследования, используют многомерную версию дисперсионного анализа. Для анализа влияния различных уровней фактора на один и тот же объект (зависимые выборки) разработан дисперсионный анализ повторных измерений (этот же подход используется при изучении временной динамики изменений результирующего признака). В данной статье будут рассмотрены однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ, а также дисперсионный анализ повторных измерений.

Однофакторный дисперсионный анализ [1, 4, 6]. Как мы уже упоминали выше: с помощью дисперсионного анализа устанавливается, какая доля общей вариации регистрируемого показателя (признака) связана с изменением градаций регулируемых (изучаемых) факторов. Выборочная вариация признака представляет собой следующую величину:

$$S = \sum_{i=1}^n (x_i - x_{\bullet})^2, \quad (1)$$

где $x_{\bullet}$ — средняя арифметическая выборки; x_i — i -ая варианта выборки. В англоязычной литературе и в

пакетах статистических программ для обозначения вариации используется аббревиатура SS .

Предположим, что мы воздействуем на изучаемые объекты фактором A , имеющим m градаций. В каждой из m независимых выборок имеется по n вариант (объектов исследования). Такую совокупность называют дисперсионным комплексом. В том случае, если количество вариант в выборках равночисленно или пропорционально, дисперсионный комплекс называют ортогональным, в противном случае — неортогональным. При планировании эксперимента (особенно при многофакторном анализе) желательно организовывать ортогональные комплексы, однако это не всегда удаётся, поэтому мы рассмотрим более общий случай однофакторного дисперсионного анализа неортогональных комплексов.

Общая вариация (S_g , general — общий) в случае однофакторного дисперсионного комплекса состоит из межгрупповой или факториальной вариации (S_f , factor), обусловленной влиянием регулируемого фактора, и случайной или остаточной или внутригрупповой вариации (S_e , error — ошибка):

$$S_g = S_f + S_e. \quad (2)$$

Предположим, что в m независимых выборок имеется по n_i вариант, тогда общее количество вариант:

$$N = \sum_{i=1}^m n_i. \quad (3)$$

Расчёт общей вариации может быть проведён по следующей формуле:

$$S_g = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - x_{\bullet\bullet})^2 = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}^2 - Nx_{\bullet\bullet}^2, \quad (4)$$

где

$$x_{\bullet\bullet} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}, \quad (5)$$

общая средняя дисперсионного комплекса; x_{ij} — варианты комплекса.

Общая средняя дисперсионного комплекса может быть также рассчитана по формуле:

$$x_{\bullet\bullet} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^m (n_i x_{i\bullet}), \quad (6)$$

где $x_{i\bullet}$ — средняя арифметическая i -ой выборки.

Расчёт факториальной вариации может быть проведён по следующей формуле:

$$S_f = \sum_{i=1}^m n_i (x_{i\bullet} - x_{\bullet\bullet})^2 = \sum_{i=1}^m n_i x_{i\bullet}^2 - Nx_{\bullet\bullet}^2, \quad (7)$$

тогда

$$S_e = S_g - S_f, \quad (8)$$

или

$$S_e = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - x_{i\bullet})^2 = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} x_{ji}^2 - \sum_{i=1}^m n_i x_{i\bullet}^2. \quad (9)$$

Разделив полученные вариации на количество степеней свободы, мы получим соответствующие выборочные дисперсии:

— для общей вариации количества степеней свободы:

$$v_g = N - 1; \quad (10)$$

— для факториальной вариации:

$$v_f = m - 1; \quad (11)$$

— для остаточной вариации:

$$v_e = N - m. \quad (12)$$

Соответствующие дисперсии (в англоязычной литературе и пакетах статистических программ применяется аббревиатура MS) будут равны:

$$s_g^2 = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - x_{\bullet\bullet})^2}{N - 1}; \quad (13)$$

$$s_f^2 = \frac{\sum_{i=1}^m n_i (x_{i\bullet} - x_{\bullet\bullet})^2}{m - 1}; \quad (14)$$

$$s_e^2 = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - x_{i\bullet})^2}{N - m}. \quad (15)$$

Так как нулевая гипотеза однофакторного дисперсионного анализа предполагает, что изучаемый регулируемый фактор не влияет на результирующий признак, то, следовательно, $s_f^2 = s_e^2$. Эта гипотеза проверяется с помощью критерия Фишера для сравнения двух дисперсий: если

$$F = \frac{s_f^2}{s_e^2} \geq F_{m-1, N-m, \alpha}, \quad (16)$$

где $m-1$, $N-m$ — количество степеней свободы; α — критический уровень значимости; $F_{m-1, N-m, \alpha}$ — α % квантиль распределения Фишера—Снедекора, то нулевая гипотеза отвергается на уровне значимости $p \leq \alpha$ (в настоящее время с помощью компьютерных программ рассчитывается точное значение p) и принимается альтернативная гипотеза о том, что регулируемый фактор изменяет результирующий признак. Теоретически F должно быть больше или равно 1, т. е. $s_f^2 \geq s_e^2$, однако иногда оказывается, что $F < 1$, такой результат может быть связан с влиянием случайности выборок. С другой стороны, значительно меньшая s_f^2 , по сравнению с s_e^2 , может указывать на серьезные нарушения требований случайности формирования выборок или о других нарушениях, приводящих к не-

корректности полученных данных. Чтобы проверить корректность полученных данных, надо рассчитать

$$F = \frac{s_e^2}{s_f^2}, \quad (17)$$

если

$$F = \frac{s_e^2}{s_f^2} < F_{N-m, m-1, \alpha}, \quad (18)$$

то различия между дисперсиями имеют случайный характер, и проверяемая нулевая гипотеза сохраняется. В противном случае надо либо искать ошибку в организации эксперимента, либо предположить большое сходство результирующего признака при различных градациях регулируемого фактора (такой эффект, например, можно наблюдать при сравнении различных линий животных). Всегда следует учитывать, что принятие нулевой гипотезы не предполагает того, что изучаемый фактор не влияет на признак, такой результат лишь даёт право сделать вывод о том, что действие фактора статистически не доказано [5].

После того как установлено статистически значимое влияние изучаемого фактора, можно рассчитать силу его влияния на результирующий признак. С этой целью могут быть использованы методы Плохинского и Снедекора. В данной работе мы рассмотрим только метод Плохинского [4, 5].

Метод Плохинского. При использовании этого метода силу влияния фактора определяют как долю факториальной (межгрупповой) вариации в общей вариации результирующего признака. Показатель силы влияния обозначают h_f^2 и рассчитывают следующим образом:

$$\eta_f^2 = \frac{S_f}{S_g}. \quad (19)$$

Критерием статистической значимости этого показателя является его отношение к своей ошибке, которую можно рассчитать по следующей приближенной формуле:

$$s_{h_f^2} = (1 - \eta_f^2) \frac{m-1}{N-m}, \quad (20)$$

где m — число градаций (уровней) изучаемого фактора; N — объём дисперсионного комплекса. Нулевую гипотезу отвергают, если

$$F = \eta_f^2 / s_{h_f^2} \geq F_{m-1, N-m, \alpha}. \quad (21)$$

Исходя из ошибки силы влияния фактора, можно рассчитать доверительный интервал этого показателя:

$$\eta_f^2 \pm s_{\eta_f^2} F_{m-1, N-m, \alpha}. \quad (22)$$

Следует учитывать, что верхняя граница силы влияния фактора не может быть больше 1, а нижняя граница — меньше 0 [4, 5].

Пример 1. На трёх группах крыс линии *SHR* изучали влияние соединений *A* и *B* в условиях многодневного введения на уровень *АД*, в контрольной группе вводили раствор натрия хлорида 0,9 % изотонический. После месячного курса инъекций оказалось, что уровни среднего *АД* составляли: в I группе (контроль, $n_1 = 5$) — 185, 187, 190, 193, 195 мм рт.ст.; во II группе (в-во *A*, $n_2 = 7$) — 165, 168, 172, 173, 175, 175, 178 мм рт.ст.; в III группе (в-во *B*, $n_3 = 6$) — 180, 182, 183, 185, 186, 189 мм рт.ст. В соответствии с планом эксперимента такие данные следует обрабатывать с помощью дисперсионного анализа. Нулевая гипотеза: препараты не влияют на *АД*. Альтернативная гипотеза: хотя бы один препарат изменяет *АД*. Для проведения дисперсионного анализа построим табл. 1, в которой будут зафиксированы результаты обработки.

Анализ дисперсионного комплекса, проведённый в табл. 1 показал, что факториальная дисперсия статистически значимо ($p < 0,01$) превышает остаточную дисперсию. Следовательно, нулевую гипотезу о том, что препараты не влияют на *АД*, следует отвергнуть.

Таким образом, фактор «Препарат» оказывает статистически значимое действие. Сила влияния фактора «Препарат», вычисленная по методу Плехинского равна: $\eta_f^2 = \frac{S_f}{S_g} = \frac{1026}{1265} = 0,811$. Следовательно, 81 % общей дисперсии комплекса можно объяснить влиянием препаратов. Ошибка силы влияния фактора

$$\text{составляет: } s_{h_f^2} = (1 - \eta_f^2) \frac{m-1}{N-m} = (1 - 0,811) \frac{2}{15} = 0,025.$$

Тогда, $F = 0,811/0,025 = 32,44 > F_{2;15;0,01} = 6,36$, следовательно, сила влияния фактора статистически значима. Доверительный 99 % интервал силы влияния фактора: $0,811 \pm 0,025 \cdot 6,36 = 0,652 \div 0,970$.

Дисперсионный анализ даёт ответ на вопрос, влияет ли изучаемый фактор на результирующий признак. Однако исследователя, как правило, интересует вопрос: есть ли различия между действием различных градаций фактора? В приведённом выше примере это вопрос: какой из препаратов статистически значимо изменяет *АД*, а какой нет? С этой целью используют методы множественных сравнений, которые будут рассмотрены ниже.

Двухфакторный дисперсионный анализ [4, 6]. Во многих фармакологических исследования изучается одновременное действие на организм двух и более факторов: влияние двух препаратов, действие вещества в условиях модели патологического состояния и т. д. С увеличением количества регулируемых факторов до 2, 3 и более процедура дисперсионного анализа не претерпевает принципиальных изменений, хотя значительно усложняется по мере увеличения числа факторов и количества их градаций.

Предположим, что изучается влияние на результирующий признак двух факторов *A* и *B*, имеющих количество градаций *a* и *b*, соответственно. Как и в случае одного фактора, общая вариация состоит из

Таблица 1

Пример проведения однофакторного дисперсионного анализа

Table 1

Example of one-factor analysis of variance

Показатель	Градации фактора «Препарат»			Оценка по всему комплексу
	Группа I контроль	Группа II препарат A	Группа III препарат B	
AD_{ij}	185 187 190 193 195	165 168 172 173 175 175 178	180 182 183 185 186 189	$m = 3$
n_i	5	7	6	$N = 18$
$AD_{i\bullet}$	190	172	184	$AD_{\bullet\bullet} = 181$
$n_i(AD_{i\bullet} - AD_{\bullet\bullet})^2$	405	567	54	$S_f = 1026; v_f = m - 1 = 2; s_f^2 = 513$
$\sum_{j=1}^{n_i} (AD_{ij} - AD_{i\bullet})^2$	68	120	51	$S_e = 239; v_e = N - m = 15; s_e^2 = 15,9$
				$S_g = S_f + S_e = 1265; v_g = N - 1; s_g^2 = 74,4$
				$F = \frac{s_f^2}{s_e^2} = 32,2642 > F_{2;15;0,01} = 6,36$

факториальной и остаточной вариаций. Однако факториальная вариация зависит от вариаций, связанных с действием факторов A и B и их взаимодействием. (Под взаимодействием факторов понимают ситуацию, когда эффект влияния одного из факторов зависит от значения других факторов). Таким образом, как и в случае однофакторного комплекса $S_g = S_f + S_e$. При этом в случае ортогонального двухфакторного комплекса имеет место соотношение

$$S_f = S_{fA} + S_{fB} + S_{fAB}, \quad (23)$$

т. е. факториальная вариация комплекса равна сумме частных факториальных вариаций, связанных с эффектами отдельных факторов и их взаимодействием. В случае неортогональных комплексов имеет место более сложная ситуация, которая усложняет вычисления, в связи с этим мы рассмотрим отдельно анализ ортогональных и неортогональных двухфакторных комплексов.

Следует отметить, что увеличение количества факторов принципиально не изменяет схемы анализа, а только увеличивает количество вычислений, в том числе количество частных вариаций, связанных с взаимодействием факторов.

Анализ ортогональных комплексов. Прежде чем начать разбор анализа двухфакторного ортогонального дисперсионного комплекса введём понятие ячейки, соответствующей паре градаций (i, j) . Ячейкой называют место в таблице опытных данных, находящееся на пересечении градаций $i = 1, 2, 3, \dots, a$ и $j = 1, 2, 3, \dots, b$. Предположим, мы имеем двухфакторный дисперсионный комплекс, в котором фактор A имеет a градаций, а фактор B — b градаций. В каждой ячейке комплекса находится по n_{ij} вариант (табл. 2).

Введём формулы для вычисления некоторых показателей:

— общее количество вариант в дисперсионном комплексе:

$$N = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b n_{ij}; \quad (24)$$

— количество вариант в одной градации фактора A (одной строке комплекса):

$$n_{i\bullet} = \sum_{j=1}^b n_{ij}; \quad (25)$$

— количество вариант в одной градации фактора B (одном столбце комплекса):

$$n_{\bullet j} = \sum_{i=1}^a n_{ij}; \quad (26)$$

— общая выборочная средняя арифметическая вариант комплекса:

$$x_{\dots} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^{n_{ij}} x_{ijk}; \quad (27)$$

— выборочная средняя арифметическая вариант i -ой градации фактора A (i -ой строки):

$$x_{i\bullet\bullet} = \frac{1}{n_{i\bullet}} \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^{n_{ij}} x_{ijk}; \quad (28)$$

— выборочная средняя арифметическая вариант j -ой градации фактора B (j -го столбца):

$$x_{\bullet j\bullet} = \frac{1}{n_{\bullet j}} \sum_{i=1}^a \sum_{k=1}^{n_{ij}} x_{ijk}; \quad (29)$$

— выборочная средняя арифметическая вариант по ячейкам, соответствующим парам градаций факторов:

$$x_{ij\bullet} = \frac{1}{n_{ij}} \sum_{k=1}^{n_{ij}} x_{ijk}. \quad (30)$$

Теперь на основании этих результатов рассчитаем вариации:

— общая вариация:

$$S_g = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk} - x_{\dots})^2 = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk})^2 - N(x_{\dots})^2; \quad (31)$$

Таблица 2

Примерная организация двухфакторного дисперсионного комплекса

Table 2

Approximate organization of a two-factor dispersion complex

		Градации фактора $B(j)$				Средняя по строкам, фактор A , $x_{i\bullet\bullet}$
		1	2	...	b	
Градации фактора $A(i)$	1	$x_{111}, x_{112}, \dots, x_{11n_{11}}$	$x_{121}, x_{122}, \dots, x_{12n_{12}}$	...	$x_{1b1}, x_{1b2}, \dots, x_{1bn_{1b}}$	$x_{1\bullet\bullet}$
	2	$x_{211}, x_{212}, \dots, x_{21n_{21}}$	$x_{221}, x_{222}, \dots, x_{22n_{22}}$	...	$x_{2b1}, x_{2b2}, \dots, x_{2bn_{2b}}$	$x_{2\bullet\bullet}$
	...	...	...	...	...	...
	a	$x_{a11}, x_{a12}, \dots, x_{a1n_{a1}}$	$x_{a21}, x_{a22}, \dots, x_{a2n_{a2}}$	...	$x_{ab1}, x_{ab2}, \dots, x_{abn_{ab}}$	$x_{a\bullet\bullet}$
Среднее по столбцам, фактор B , $x_{\bullet j\bullet}$		$x_{\bullet 1\bullet}$	$x_{\bullet 2\bullet}$	...	$x_{\bullet b\bullet}$	$x_{\dots}$

– суммарная факториальная вариация:

$$S_f = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b n_{ij} (x_{ij\bullet} - x_{\dots})^2 = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b n_{ij} (x_{ij\bullet})^2 - N(x_{\dots})^2; \quad (32)$$

– вариация, обусловленная влиянием фактора A :

$$S_{fA} = \sum_{i=1}^a n_{i\bullet} (x_{i\bullet} - x_{\dots})^2 = \sum_{i=1}^a n_{i\bullet} (x_{i\bullet})^2 - N(x_{\dots})^2; \quad (33)$$

– вариация, обусловленная влиянием фактора B :

$$S_{fB} = \sum_{j=1}^b n_{\bullet j} (x_{\bullet j} - x_{\dots})^2 = \sum_{j=1}^b n_{\bullet j} (x_{\bullet j})^2 - N(x_{\dots})^2; \quad (34)$$

– вариация, обусловленная взаимодействием факторов A и B :

$$\begin{aligned} S_{fAB} &= \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b n_{ij} (x_{ij\bullet} - x_{i\bullet} - x_{\bullet j} + x_{\dots})^2 = \\ &= \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b n_{ij} (x_{ij\bullet})^2 - S_{fA} - S_{fB} - N(x_{\dots})^2 = \\ &= S_f - S_{fA} - S_{fB}; \end{aligned} \quad (35)$$

– остаточная вариация:

$$\begin{aligned} S_e &= \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk} - x_{ij\bullet})^2 = \\ &= \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk})^2 - \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b n_{ij} (x_{ij\bullet})^2 = S_g - S_f. \end{aligned} \quad (36)$$

Разделив полученные вариации на количество степеней свободы, мы получим соответствующие дисперсии:

– для общей вариации количество степеней свободы:

$$v_g = N - 1; \quad (37)$$

– для суммарной факториальной вариации:

$$v_f = ab - 1; \quad (38)$$

– для вариации, обусловленной фактором A :

$$v_{fA} = a - 1; \quad (39)$$

– для вариации, обусловленной фактором B :

$$v_{fB} = b - 1; \quad (40)$$

– для вариации, обусловленной взаимодействием факторов A и B :

$$v_{fAB} = (a - 1)(b - 1); \quad (41)$$

– для остаточной вариации:

$$v_e = N - ab. \quad (42)$$

Соответствующие дисперсии (в англоязычной литературе и пакетах статистических программ применяется аббревиатура MS) будут равны:

– общая дисперсия комплекса:

$$s_g^2 = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk} - x_{\dots})^2}{N - 1} = \frac{S_g}{N - 1}; \quad (43)$$

– суммарная факториальная дисперсия:

$$s_f^2 = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b n_{ij} (x_{ij\bullet} - x_{\dots})^2}{ab - 1} = \frac{S_f}{ab - 1}; \quad (44)$$

– дисперсия, обусловленная действием фактора A :

$$s_{fA}^2 = \frac{\sum_{i=1}^a n_{i\bullet} (x_{i\bullet} - x_{\dots})^2}{a - 1} = \frac{S_{fA}}{a - 1}; \quad (45)$$

– дисперсия, обусловленная действием фактора B :

$$s_{fB}^2 = \frac{\sum_{j=1}^b n_{\bullet j} (x_{\bullet j} - x_{\dots})^2}{b - 1} = \frac{S_{fB}}{b - 1}; \quad (46)$$

– дисперсия, обусловленная взаимодействием факторов A и B :

$$\begin{aligned} s_{fAB}^2 &= \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b n_{ij} (x_{ij\bullet} - x_{i\bullet} - x_{\bullet j} + x_{\dots})^2}{(a - 1)(b - 1)} = \\ &= \frac{S_f - S_{fA} - S_{fB}}{(a - 1)(b - 1)} = \frac{S_{fAB}}{(a - 1)(b - 1)}; \end{aligned} \quad (47)$$

– остаточная дисперсия:

$$s_e^2 = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk} - x_{ij\bullet})^2}{N - ab} = \frac{S_e}{N - ab}. \quad (48)$$

При проведении двухфакторного дисперсионного анализа проверяют три нулевые гипотезы:

1. Фактор A не изменяет результирующий признак, т. е. $s_{fA}^2 = s_e^2$;

2. Фактор B не изменяет результирующий признак, т. е. $s_{fB}^2 = s_e^2$;

3. Взаимодействие факторов A и B не изменяет результирующий признак, т. е. $s_{fAB}^2 = s_e^2$.

Эти гипотезы проверяются с помощью критерия Фишера для сравнения двух дисперсий. С этой целью вычисляются соответствующие дисперсионные отношения: если соблюдаются перечисленные ниже неравенства

$$F_{fA} = \frac{s_{fA}^2}{s_e^2} \geq F_{a-1, N-ab, \alpha}; \quad (49)$$

$$F_{fB} = \frac{s_{fB}^2}{s_e^2} \geq F_{b-1, N-ab, \alpha}; \quad (50)$$

$$F_{fAB} = \frac{s_{fAB}^2}{s_e^2} \geq F_{(a-1)(b-1), N-ab, \alpha}, \quad (51)$$

то соответствующие нулевые гипотезы отвергаются на уровне значимости α и принимаются альтернативные гипотезы о том, что тот или иной регулируемый фактор или их совместное действие (взаимодействие) изменяют результирующий признак [4, 6].

Силу влияния факторов определяют по Плохинскому так же, как для однофакторных дисперсионных комплексов: рассчитывают отношение частных факториальных вариаций к общей вариации. Ошибку силы влияния факторов определяют по следующим формулам [5]:

$$s_{\eta_f^2} = v_f \frac{\eta_e^2}{v_e}; \quad (52)$$

$$s_{\eta_A^2} = v_A \frac{\eta_e^2}{v_e}; \quad (53)$$

$$s_{\eta_B^2} = v_B \frac{\eta_e^2}{v_e}; \quad (54)$$

$$s_{\eta_{AB}^2} = v_{AB} \frac{\eta_e^2}{v_e}. \quad (55)$$

Статистическую значимость силы влияния фактора и её доверительный интервал определяют также как в случае однофакторного комплекса.

Пример 2. В эксперименте на крысах изучали влияние препарата *A* на функцию сердца в условиях экспериментального инфаркта миокарда. Было проведено 4 серии экспериментов по 5 животных в каждой: ложнооперированные крысы, получавшие плацебо; ложнооперированные животные, которым вводили препарат *A*; крысы с экспериментальным инфарктом миокарда, получавшие плацебо; животные с экспериментальным инфарктом миокарда, которым вводили препарат *A*. О функции сердца судили по фракции выброса, полученной в результате эхокардиографических измерений и рассчитанной в % (табл. 3). Нулевая гипотеза: изучаемые факторы и их взаимодействие не влияют на фракцию выброса. Альтернативная гипотеза: хотя бы один из факторов или их взаимодействие изменяют изучаемый показатель. Рассчитаем вариации:

$$S_{fA} = \sum_{i=1}^a n_{i\bullet} (x_{i\bullet})^2 - N(x_{\bullet\bullet})^2 = 10 \cdot 89,5^2 + 10 \cdot 67^2 - 20 \cdot 78,25^2 = 2531,25;$$

Таблица 3

Пример проведения двухфакторного дисперсионного анализа ортогонального комплекса

Table 3

An example of a two-factor analysis of variance of an orthogonal complex

Фактор <i>A</i>	Препарат (фактор <i>B</i>)		Средняя по строкам, $x_{i\bullet}$
	Плацебо ($j = 1$)	Препарат <i>A</i> ($j = 2$)	
Ложная операция ($i = 1$)	85, 83, 89, 92, 95 $x_{11\bullet} = 88,8$	89, 90, 92, 95, 85 $x_{12\bullet} = 90,2$	89,5
Инфаркт миокарда ($i = 2$)	57, 60, 62, 65, 68 $x_{21\bullet} = 62,4$	68, 70, 72, 73, 75 $x_{22\bullet} = 71,6$	67,0
Средняя по столбцам, $x_{\bullet j}$	75,6	80,9	$x_{\bullet\bullet} = 78,25$
Вариации	$S_{fA} = 2531,25; S_{fB} = 140,45; S_{fAB} = 76,05; S_f = 2747,75; S_e = 254; S_g = 3001,75$		
Степени вободы	$v_g = 19; v_f = 3; v_{fA} = 1; v_{fB} = 1; v_{fAB} = 1; v_e = 16$		
Дисперсии	$s_g^2 = 157,99; s_f^2 = 915,92; s_{fA}^2 = 2531,25; s_{fB}^2 = 140,45; s_{fAB}^2 = 76,05; s_e^2 = 15,875$		
F	$F_f = 57,70 > F_{3,16;0,01} = 5,29; F_{fA} = 159,45 > F_{1,16;0,01} = 8,53; F_{fB} = 8,85 > F_{1,16;0,01} = 8,53; F_{fAB} = 4,79 > F_{1,16;0,05} = 4,49$		
h^2	$\eta_f^2 = \frac{2747,75}{3001,75} = 0,915; \eta_{fA}^2 = \frac{2531,25}{3001,75} = 0,843; \eta_{fB}^2 = \frac{140,45}{3001,75} = 0,047; \eta_{fAB}^2 = \frac{76,05}{3001,75} = 0,025; \eta_e^2 = \frac{254}{3001,75} = 0,085$		
s_{h^2}	$s_{\eta_f^2} = 3 \cdot \frac{0,085}{16} = 0,016; s_{\eta_{fA}^2} = 1 \cdot \frac{0,085}{16} = 0,005; s_{\eta_{fB}^2} = 1 \cdot \frac{0,085}{16} = 0,005; s_{\eta_{fAB}^2} = 1 \cdot \frac{0,085}{16} = 0,005$		

$$S_{fB} = \sum_{j=1}^b n_{\cdot j} (x_{\cdot j})^2 - N(x_{\dots})^2 =$$

$$= 10 \cdot 75,6^2 + 10 \cdot 80,9^2 - 20 \cdot 78,25^2 = 140,45;$$

$$S_{fAB} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b n_{ij} (x_{ij})^2 - S_{fA} - S_{fB} - N(x_{\dots})^2 = 76,05;$$

$$S_e = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk})^2 - \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b n_{ij} (x_{ij})^2 = 254.$$

Используя соответствующие степени свободы, рассчитаем дисперсии. Применив критерий Фишера, проверим нулевую гипотезу о равенстве факториальных и остаточной дисперсий.

Таким образом, анализ данных, приведённых в табл. 3, показал, что нулевые гипотезы следует отвергнуть, суммарная и все частные факториальные дисперсии статистически значимо отличаются от остаточной дисперсии. Рассчитаем силы влияния факторов и их ошибки. Анализ показал, что наибольшей силой влияния обладает фактор А, который определяет 84,3 % общей вариации. Фактор В определяет 4,7 % вариации, а взаимодействие факторов очень мало составляет — только 2,5 % вариации. Рассчитаем статистическую значимость силы влияния факторов:

$$F_{\eta_f^2} = 0,915 / 0,016 = 57,19 > F_{3,16;0,01} = 5,29;$$

$$F_{\eta_{fA}^2} = 0,843 / 0,005 = 168,6 > F_{1,16;0,01} = 8,53;$$

$$F_{\eta_{fB}^2} = 0,047 / 0,005 = 9,4 > F_{1,16;0,01} = 8,53;$$

$$F_{\eta_{fAB}^2} = 0,025 / 0,005 = 5 > F_{1,16;0,05} = 4,43.$$

Таким образом, сила обоих факторов и их взаимодействие статистически значимы.

Анализ неортогональных комплексов. В неортогональных комплексах также как в ортогональных общая дисперсия разлагается на факториальную и остаточную, при этом $S_g = S_f + S_e$. Однако при разложении факториальной вариации неортогональных комплексов имеет место неравенство: $S_f \neq S_{fA} + S_{fB} + S_{fAB}$. Суммарную факториальную вариацию неортогонального комплекса можно представить в следующем виде: $S_f = S_{fA} + S_{fB} + S_{fAB} + e$. В связи с изложенным для расчёта S_g , S_f и S_e применяют те же формулы, что для ортогональных двухфакторных комплексов:

$$S_g = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk} - x_{\dots})^2 = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk})^2 - N(x_{\dots})^2; \quad (56)$$

$$S_f = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b n_{ij} (x_{ij} - x_{\dots})^2 = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b n_{ij} (x_{ij})^2 - N(x_{\dots})^2; \quad (57)$$

$$S_e = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk} - x_{ij})^2 =$$

$$= \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk})^2 - \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b n_{ij} (x_{ij})^2. \quad (58)$$

Для расчёта частных факториальных вариаций можно применить следующий подход: по специальным формулам рассчитываются вспомогательные вариации S'_{fA} , S'_{fB} , S'_{fAB} . В данном случае будет иметь место равенство:

$$S'_f = S'_{fA} + S'_{fB} + S'_{fAB}, \quad (59)$$

поэтому вспомогательная вариация взаимодействия факторов будет равна

$$S'_{fAB} = S'_f - S'_{fA} - S'_{fB}. \quad (60)$$

Затем суммарная факториальная вариация, вычисленная обычным способом разлагается на свои три компонента пропорционально вспомогательным вариациям S'_{fA} , S'_{fB} и S'_{fAB} . Для того чтобы провести эту операцию необходимо рассчитать коэффициент пропорциональности, который равен отношению общей факториальной вариации к вспомогательной суммарной факториальной вариации:

$$\alpha = \frac{S_f}{S'_f}. \quad (61)$$

Таким образом, частные факториальные вариации в неортогональном двухфакторном дисперсионном комплексе будут равны: $S_{fA} = \alpha S'_{fA}$; $S_{fB} = \alpha S'_{fB}$; $S_{fAB} = \alpha S'_{fAB}$.

Рассчитаем вспомогательные вариации (условные обозначения те же, что и были при разборе обработки ортогональных дисперсионных комплексов):

— суммарная вспомогательная факториальная вариация:

$$S'_f = N \left(\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b (x_{ij})^2}{ab} - \left(\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b x_{ij}}{ab} \right)^2 \right); \quad (62)$$

— вспомогательная факториальная вариация, обусловленная действием фактора А:

$$S'_{fA} = N \left(\frac{\sum_{i=1}^a \left(\frac{1}{b} \sum_{j=1}^b x_{ij} \right)^2}{a} - \left(\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b x_{ij}}{ab} \right)^2 \right); \quad (63)$$

— вспомогательная факториальная вариация, обусловленная действием фактора В:

$$S'_{fB} = N \left(\frac{\sum_{j=1}^b \left(\frac{1}{a} \sum_{i=1}^a x_{ij} \right)^2}{b} - \left(\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b x_{ij}}{ab} \right)^2 \right); \quad (64)$$

– вспомогательная вариация, отражающая взаимодействие факторов A и B :

$$S'_{fAB} = S'_f - S'_{fA} - S'_{fB}. \quad (65)$$

Дальнейший анализ неортогональных комплексов не отличается от анализа ортогональных [4].

Пример 3. Используем данные примера 2, немного изменив их так, чтобы дисперсионный комплекс стал неортогональным (табл. 4).

Рассчитаем вариации, расчёт которых не зависит от формы комплекса:

– общая вариация:

$$S_g = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk})^2 - N(x_{...})^2 = 125057 - 20(78,25)^2 = 125057 - 122461,25 = 2595,75;$$

– суммарная факториальная вариация:

$$S_f = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b n_{ij} (x_{ij\bullet})^2 - N(x_{...})^2 = 124883 - 122461,25 = 2421,75;$$

– остаточная вариация:

$$S_e = S_g - S_f = 2595,75 - 2421,75 = 174.$$

Следующий шаг расчёт вспомогательных факториальных вариаций:

– общая вспомогательная факториальная вариация:

$$S'_f = N \left(\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b (x_{ij\bullet})^2}{ab} - \left(\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b x_{ij\bullet}}{ab} \right)^2 \right) = 20 \cdot \left(\frac{85^2 + 89^2 + 62^2 + 73^2}{4} - \left(\frac{309}{4} \right)^2 \right) = 2243,75.$$

Тогда коэффициент пропорциональности

$$\alpha = \frac{S'_f}{S_f} = \frac{2421,75}{2243,75} = 1,079;$$

– вспомогательная факториальная вариация, обусловленная действием фактора A :

Таблица 4

Пример проведения двухфакторного дисперсионного анализа неортогонального комплекса

Table 4

Example of two-factor analysis of variance of a non-orthogonal complex

Фактор A	Препарат (фактор B)		Средняя по ячейкам фактор A
	Плацибо ($j = 1$)	Препарат A ($j = 2$)	
Ложная операция ($i = 1$)	85, 84, 89 $x_{11\bullet} = 85$	88, 90, 91, 94, 84, 87, 89 $x_{12\bullet} = 89$	87,5
Инфаркт миокарда ($i = 2$)	56, 60, 62, 65, 67 $x_{21\bullet} = 62$	71, 72, 73, 76, $x_{22\bullet} = 73$	66,9
Средняя по ячейкам фактор B	72,2	83,2	$x_{...} = 78,25$ Общая средняя комплекса
Вспомогательные факториальные вариации	$S'_f = 2243,75$; $S'_{fA} = 1901,25$; $S'_{fB} = 281,25$; $S'_{fAB} = 61,25$; $\alpha = 1,079331476$		
Вариации	$S_{fA} = 2052,08$; $S_{fB} = 303,56$; $S_{fAB} = 66,11$; $S_f = 2421,75$; $S_e = 174$; $S_g = 2595,75$		
Степени свободы	$v_g = 19$; $v_f = 3$; $v_{fA} = 1$; $v_{fB} = 1$; $v_{fAB} = 1$; $v_e = 16$		
Дисперсии	$s_g^2 = 136,62$; $s_f^2 = 807,25$; $s_{fA}^2 = 2052,08$; $s_{fB}^2 = 303,56$; $s_{fAB}^2 = 66,11$; $s_e^2 = 10,875$		
F	$F_f = 74,26 > F_{3,16;0,01} = 5,29$; $F_{fA} = 188,70 > F_{1,16;0,01} = 8,53$; $F_{fB} = 27,91 > F_{1,16;0,01} = 8,53$; $F_{fAB} = 6,08 > F_{1,16;0,05} = 4,49$		
h^2	$\eta_f^2 = \frac{2421,75}{2595,75} = 0,933$; $\eta_{fA}^2 = \frac{2052,08}{2595,75} = 0,791$; $\eta_{fB}^2 = \frac{303,56}{2595,75} = 0,117$; $\eta_{fAB}^2 = \frac{66,11}{2595,75} = 0,025$; $\eta_e^2 = \frac{174}{2595,75} = 0,067$		
s_{h^2}	$s_{\eta_f^2} = 3 \cdot \frac{0,067}{16} = 0,013$; $s_{\eta_{fA}^2} = 1 \cdot \frac{0,067}{16} = 0,004$; $s_{\eta_{fB}^2} = 1 \cdot \frac{0,067}{16} = 0,004$; $s_{\eta_{fAB}^2} = 1 \cdot \frac{0,067}{16} = 0,004$		

$$S'_{fA} = N \left(\frac{\sum_{i=1}^a \left(\frac{1}{b} \sum_{j=1}^b x_{ij\bullet} \right)^2}{a} - \left(\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b x_{ij\bullet}}{ab} \right)^2 \right) =$$

$$= 20 \cdot \left(\frac{\left(\frac{85+89}{2} \right)^2 + \left(\frac{62+73}{2} \right)^2}{2} - \left(\frac{309}{4} \right)^2 \right) = 1901,25;$$

– вспомогательная факториальная вариация, обусловленная действием фактора *B*:

$$S'_{fB} = N \left(\frac{\sum_{j=1}^b \left(\frac{1}{a} \sum_{i=1}^a x_{ij\bullet} \right)^2}{b} - \left(\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b x_{ij\bullet}}{ab} \right)^2 \right) =$$

$$= 20 \cdot \left(\frac{\left(\frac{85+62}{2} \right)^2 + \left(\frac{89+73}{2} \right)^2}{2} - \left(\frac{309}{4} \right)^2 \right) = 281,25;$$

– вспомогательная факториальная вариация, отражающая взаимодействие факторов *A* и *B*:

$$S'_{fAB} = S'_f - S'_{fA} - S'_{fB} = 2243,75 - 1901,25 - 281,25 = 61,25.$$

Используя коэффициент пропорциональности α , рассчитываем несмещённые вариации (см. табл. 4). Далее обработка и анализ проводятся также как в случае ортогональных комплексов.

Анализ полученных в данном примере результатов показал, что оба изучаемых фактора статистически значимо изменяют результирующий показатель, при этом наблюдается статистически значимое взаимодействие факторов. Действительно в условиях инфаркта

миокарда изучаемый препарат более заметно увеличивает фракцию выброса. При этом фактор А (инфаркт миокарда) определяет 79,1 % вариации признака, фактор В — 11,7 %, при этом сила взаимодействия факторов статистически значима.

Дисперсионный анализ повторных измерений. В экспериментальной фармакологии достаточно часто проводят эксперименты, в которых животное является само себе контролем, при этом регистрация параметров производится более чем 2 раза: например, изучение действия лекарственного средства в различных временных точках после введения (контролем служит исходный уровень показателя). В таких случаях исследователи часто применяют критерий Стьюдента для зависимых выборок или знаково-ранговый критерий Вилкоксона. Такой подход является грубой ошибкой, так как в этих случаях начинает действовать эффект множественных сравнений (см. выше), в результате может быть получена заниженная вероятность ошибки I рода (ложно положительный результат). В этом случае, если полученные данные имеют нормальное или близкое к нему распределение следует использовать дисперсионный анализ повторных измерений с дальнейшей обработкой каким-либо методом множественных сравнений. Следует отметить, что дисперсионный анализ повторных измерений в большинстве статистических программ реализован таким образом, что он даёт возможность проводить одновременное сравнение зависимых и независимых выборок (например, анализ изменений показателя под влиянием препарата во времени в условиях нормы и патологии). В данной статье мы рассмотрим наиболее простой случай — сравнения нескольких зависимых выборок.

Таблица 5

Примерная организация комплекса дисперсионного анализа повторных измерений

Table 5

Approximate organization of the complex of variance analysis of repeated measurements

Животное	1 точка	2 точка	3 точка	...	М точка	Среднее по животному, $x_{i\bullet}$	Внутрииндивидуальная вариация, S_{ii}
1	x_{11}	x_{12}	$x_{1,3}$	...	x_{1m}	$x_{1\bullet}$	$\sum_{j=1}^m (x_{1j} - x_{1\bullet})^2$
2	x_{21}	x_{22}	x_{23}	...	x_{2m}	$x_{2\bullet}$	$\sum_{j=1}^m (x_{2j} - x_{2\bullet})^2$
3	x_{31}	x_{32}	x_{33}	...	x_{3m}	$x_{3\bullet}$	$\sum_{j=1}^m (x_{3j} - x_{3\bullet})^2$
.....				...			...
<i>n</i>	x_{n1}	x_{n2}	x_{n3}	...	x_{nm}	$x_{n\bullet}$	$\sum_{j=1}^m (x_{nj} - x_{n\bullet})^2$
Среднее по точкам, $x_{\bullet j}$	$x_{\bullet 1}$	$x_{\bullet 2}$	$x_{\bullet 3}$	...	$x_{\bullet m}$		

Предположим, что мы провели эксперименты на n животных, у которых зарегистрировали результирующий показатель до введения вещества и $m - 1$ раз после (табл. 5).

Значения результирующего признака обозначены как x_{ij} , где i — номер животного, j — точка измерения, тогда среднее значение результирующего признака у i -го животного:

$$x_{i\bullet} = \frac{\sum_{j=1}^m x_{ij}}{m}; \quad (66)$$

— среднее значение изучаемого признака в j — точке измерения:

$$x_{\bullet j} = \frac{\sum_{i=1}^n x_{ij}}{n}; \quad (67)$$

— общая средняя данного дисперсионного комплекса:

$$x_{\bullet\bullet} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m x_{ij}}{mn}. \quad (68)$$

Общая вариация — это сумма отклонений всех значений измерений от общего среднего:

$$S_g = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (x_{ij} - x_{\bullet\bullet})^2 = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \left(x_{ij} - \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m x_{ij}}{mn} \right)^2. \quad (69)$$

Соответствующее число степеней свободы:

$$v_g = mn - 1. \quad (70)$$

Общая вариация такого рода дисперсионного комплекса состоит из внутрииндивидуальной и межиндивидуальной вариаций:

$$S_g = S_{ii} + S_{bi}. \quad (71)$$

Для того, чтобы рассчитать общую внутрииндивидуальную вариацию следует сложить частные внутрииндивидуальные вариации каждого члена дисперсионного комплекса (крайний правый столбец табл. 5):

$$S_{ii} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (x_{ij} - x_{i\bullet})^2. \quad (72)$$

Соответствующее число степеней свободы:

$$v_{ii} = n(m - 1). \quad (73)$$

Межиндивидуальная вариация представляет собой сумму квадратов отклонений индивидуальных (по каждому животному) средних от общего среднего:

$$S_{bi} = m \sum_{i=1}^n (x_{i\bullet} - x_{\bullet\bullet})^2. \quad (74)$$

Множитель m появляется вследствие того, что $x_{i\bullet}$ — это среднее каждого члена комплекса по m точкам. Соответствующее число степеней свободы:

$$v_{bi} = n - 1. \quad (75)$$

Для того, чтобы выяснить есть ли различие между повторными измерениями результирующего признака, необходимо проанализировать внутрииндивидуальную вариацию, которая состоит из факториальной вариации (S_f), связанной с изучаемым воздействием, и остаточной вариации (S_e), связанной со случайными отклонениями и ошибками измерений:

$$S_{ii} = S_f + S_e. \quad (76)$$

Факториальная вариация в данном случае представляет собой сумму квадратов отклонений средних по точкам измерения от общего среднего:

$$S_f = n \sum_{j=1}^m (x_{\bullet j} - x_{\bullet\bullet})^2. \quad (77)$$

Коэффициент n вводится из-за того, что каждое $x_{\bullet j}$ — это среднее по n объектам. Число степеней свободы:

$$v_f = m - 1. \quad (78)$$

Остаточную вариацию получают вычитанием факториальной вариации из внутрииндивидуальной:

$$S_e = S_{ii} - S_f. \quad (79)$$

Точно также вычисляется и число степеней свободы остаточной вариации:

$$v_e = v_{ii} - v_f = n(m - 1) - (m - 1) = (n - 1)(m - 1). \quad (80)$$

Зная факториальную и остаточную вариации и соответствующие числа свободы можно рассчитать две независимые оценки дисперсий:

$$s_f^2 = \frac{S_f}{v_f} = \frac{S_f}{m - 1} \quad (81)$$

и

$$s_e^2 = \frac{S_e}{v_e} = \frac{S_e}{(n - 1)(m - 1)}. \quad (82)$$

Зная оценки дисперсий можно применить рассмотренный нами ранее критерий Фишера F [1, 5, 7]:

$$F = \frac{s_f^2}{s_e^2}. \quad (83)$$

Далее, как и при обычном однофакторном дисперсионном анализе, рассчитанное значение F сравнивают с критическим значением для выбранного уровня значимости и соответствующего числа степеней свободы. Силу влияния фактора рассчитывают также как и при обычном однофакторном дисперсионном анализе (см. выше).

Пример 4. В экспериментах на 5 наркотизированных кошках изучали влияния соединения А на объёмную скорость коронарного кровотока, оцениваемую по оттоку из венечного синуса в мл/мин. Кровоток регистрировали перед внутривенным введением вещества, через 5, 10, 20 и 30 минут после него. Нулевая гипотеза: вещество не изменяет изучаемый показатель. Альтернативная гипотеза: хотя бы в одной временной точке измеряемая величина отличается от исходного уровня. Данные и алгоритм обработки приведены в табл. 6.

Рассчитаем общую среднюю дисперсионного комплекса: $x_{..} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m x_{ij}}{mn} = 3,56$. На основе этих данных рас-

считаем общую вариацию: $S_g = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (x_{ij} - x_{..})^2 = 5,20$.

Общая дисперсия комплекса, соответственно, равна общей вариации деленной на количество степеней

свободы $(mn - 1)$: $s_g^2 = \frac{S_g}{mn - 1} = \frac{5,20}{24} = 0,217$.

Далее вычисляем общую внутрииндивидуальную вариацию, которая равна сумме частных внутрииндивидуальных вариаций каждого члена комплекса (крайний правый столбец табл. 6): $S_{ij} = 0,6 + 0,22 + 0,06 + 0,38 + 0,14 = 1,40$, соответственно, межиндивидуальная вариация будет равна разности между общей вариацией и внутрииндивидуальной вариацией: $S_{bi} = S_g - S_{ij} = 5,20 - 1,40 = 3,80$. Соответствующие дисперсии будут равны вариациям, деленным на количество степеней свободы: $s_{ii}^2 = \frac{S_{ii}}{n(m-1)} = \frac{1,40}{20} = 0,07$ и

$s_{bi}^2 = \frac{S_{bi}}{n-1} = \frac{3,80}{4} = 0,95$.

Как мы отметили ранее, общая внутрииндивидуальная вариация комплекса представляет собой сумму факториальной и остаточной вариаций. Рассчитаем факториальную вариацию:

$$S_f = n \sum_{j=1}^m (x_{.j} - x_{..})^2 = 5 \cdot ((3,3 - 3,56)^2 + (3,9 - 3,56)^2 + (3,7 - 3,56)^2 + (3,5 - 3,56)^2 + (3,4 - 3,56)^2) = 1,16.$$

Тогда остаточная вариация: $S_e = S_{ii} - S_f = 1,40 - 1,16 = 0,24$. Факториальная и остаточная дисперсии будут, соответственно, равны:

$$s_f^2 = \frac{S_f}{m-1} = \frac{1,16}{4} = 0,29$$

и

$$s_e^2 = \frac{S_e}{(n-1)(m-1)} = \frac{0,24}{16} = 0,015.$$

Тогда показатель критерия Фишера

$$F = \frac{s_f^2}{s_e^2} = \frac{0,29}{0,015} = 19,333 > F_{4,16;0,01} = 4,77.$$

Таким образом, на уровне $p < 0,01$ нулевую гипотезу можно отвергнуть и принять альтернативную гипотезу о том, что исследуемое вещество изменяет объёмную скорость коронарного кровотока. При этом

сила действия фактора равна: $\eta_f^2 = \frac{S_f}{S_g} = \frac{1,16}{5,20} = 0,223$.

Таким образом, изучаемый фактор определяет 22,3 % вариации.

Критерии множественных сравнений, используемые после проведения дисперсионного анализа. Как уже было отмечено выше, дисперсионный анализ даёт возможность выявить статистическую значимость влияния регулируемого фактора на изучаемый признак (показатель). Однако исследователя-фармаколога почти всегда интересует на сколько эффективно действуют различные градации этого фактора. В связи с этим, если согласно результатам дисперсионного анализа принимается альтернативная гипотеза о том, что ре-

Таблица 6

Пример проведения дисперсионного анализа повторных измерений

Table 6

Example of the analysis of variance of repeated measurements

Животное	Исходный уровень	Время после введения вещества, мин				Среднее по животному, $x_{.j}$	Внутрииндивидуальная вариация, S_{ii}
		5	10	20	30		
1	4,0	4,8	4,4	4,2	3,8	4,2	0,6
2	3,5	4,0	3,8	3,5	3,5	3,7	0,22
3	3,4	3,6	3,5	3,4	3,3	3,4	0,06
4	3,0	3,8	3,6	3,3	3,5	3,4	0,38
5	2,8	3,3	3,0	3,0	2,9	3,0	0,14
Среднее по временным точкам, $x_{.j}$	3,3	3,9	3,7	3,5	3,4	—	—

гулируемый фактор оказывает значимое воздействие на изучаемый признак, исследователь анализирует статистическую значимость воздействия каждой градации фактора по сравнению с другими. Такой анализ позволяют провести методы множественных сравнений: критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, критерий Ньюмена–Кейлса, критерий Даннета, критерий Шеффе, критерий Дункана и др. Многие из них основаны на критерии Стьюдента, но учитывают, что сравнивается более одной пары выборок.

Критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Данный метод основан на применении неравенства Бонферрони, согласно которому если k раз применить критерий с уровнем значимости α , то вероятность хотя бы в одном случае найти различие там, где его нет (ошибка I рода) не превышает произведения k на α : $\alpha' \leq k\alpha$ (где α' вероятность ошибки I рода хотя бы в одном сравнении). Следовательно, α' и является истинным уровнем значимости в случае, если количество сравнений больше 1. Из неравенства Бонферрони можно сделать вывод о том, что, если мы хотим обеспечить вероятность ошибки I рода α , то в каждом сравнении необходимо принять уровень значимости α/k . Например, при трёхкратном сравнении, для того чтобы вероятность ошибки I рода была не более 0,05, надо использовать уровень значимости $0,05/3 = 0,017$. Следует отметить, что число сравнений k зависит от поставленной задачи: если необходимо сравнить каждую выборку со всеми остальными, то

$$k = m(m - 1)/2; \quad (84)$$

если надо сравнить опытные выборки с контрольной группой, то

$$k = m - 1, \quad (85)$$

где m — количество изучаемых выборок [1, 4, 7].

Поправка Бонферрони хорошо работает, если число сравнений относительно невелико. Если оно превышает 6, метод становится маломощным (слишком «строгим») и даже весьма большие различия становятся незначимыми. Строгость поправки Бонферрони можно смягчить, увеличив число степеней свободы, используя оценку остаточной дисперсии, полученную при проведении дисперсионного анализа. В случае однофакторного дисперсионного анализа, если количество групп больше 2, число степеней свободы $\nu_e = N - m$, (12). Тогда

$$t = \frac{x_{i\bullet} - x_{j\bullet}}{\sqrt{\frac{s_e^2}{n_1} + \frac{s_e^2}{n_2}}}, \quad (86)$$

где i, j — номера выборок, $i \neq j$, если полученное $t \geq t_{\alpha/k, \nu_e}$, то нулевую гипотезу о равенстве средних следует отвергнуть. (В настоящее время все расчёты проводятся с помощью статистических пакетов программ. Однако, если приходится пользоваться

таблицами, то $t_{кр.}$ для отсутствующего в таблицах α можно рассчитать по следующей формуле:

$$t_{кр.} \approx t_1 + (t_2 - t_1) \frac{\alpha_{кр.} - \alpha_1}{\alpha_2 - \alpha_1}, \quad (87)$$

где α_1 и α_2 — табличные значения вероятностей, между которыми находится $\alpha_{кр.}$ [5].

Если имеется возможность рассчитать точное значение вероятности ошибки I рода при сравнении пар выборок, то можно несколько изменить поправку Бонферрони, умножая полученные значения p на k и сравнивая полученное значение p' с критическим уровнем значимости $\alpha_{кр.}$ [1, 4–7]. Приведём пример использования критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для данных, предварительно обработанных с помощью однофакторного дисперсионного анализа.

Пример 5. Используем данные примера 1. Проведённый ранее дисперсионный анализ показал, что действие изучаемого фактора статистически значимо. Так как мы изучаем влияние препаратов на АД, мы будем проводить сравнение 2 опытных групп с контрольной выборкой. Согласно нулевой гипотезе в каждом сравнении опытная группа не отличается от контрольной. Критический уровень значимости $\alpha_{кр.} = 0,05$. Так как мы проводим 2 сравнения, то следует использовать поправку Бонферрони, соответственно, $\alpha' = \alpha_{кр.}/2 = 0,025$. Сравним контрольную группу с животными, получавшими препарат А:

$$t = \frac{x_{1\bullet} - x_{2\bullet}}{\sqrt{\frac{s_e^2}{n_1} + \frac{s_e^2}{n_2}}} = \frac{190 - 172}{\sqrt{\frac{15,9}{5} + \frac{15,9}{7}}} = 7,709 > t_{\nu_e, \alpha'} = t_{15, 0,025} = 2,48988.$$

Таким образом, нулевая гипотеза для препарата А может быть отвергнута и сделан вывод о том, что АД у животных, получавших препарат А, статистически значимо ($p < 0,05$) меньше, чем у крыс контрольной группы. Проведём такие же расчёты для сравнения контроля с животными, получавшими препарат В:

$$t = \frac{x_{1\bullet} - x_{3\bullet}}{\sqrt{\frac{s_e^2}{n_1} + \frac{s_e^2}{n_2}}} = \frac{190 - 184}{\sqrt{\frac{15,9}{5} + \frac{15,9}{6}}} = 2,485 < t_{\nu_e, \alpha'} = t_{15, 0,025} = 2,48988.$$

Таким образом, для препарата В принимается нулевая гипотеза. Если рассчитать точные p , то для препарата А — $p = 0,000001$, а для препарата В — $p = 0,025242$. Тогда $p'_A = 0,000002$, $p'_B = 0,050484$. Таким образом, заключение при обоих методах расчёта будет одинаковым.

Обработка результатов множественных сравнений с помощью критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони, проводимая после дисперсионного анализа

повторных измерений, принципиально не отличается от описанной выше:

$$t = \frac{x_{i\bullet} - x_{j\bullet}}{\sqrt{\frac{2s_e^2}{n}}}, \quad (88)$$

где i, j — точки повторных измерений. Полученное значение следует сравнивать с критическим значением для распределения Стьюдента с числом степеней свободы [1, 6, 7]:

$$v_e = (n - 1)(m - 1). \quad (89)$$

Пример 6. Используем данные примера 4. Дисперсионный анализ повторных измерений показал, что изучаемый препарат статистически значимо увеличивает объёмную скорость коронарного кровотока. Необходимо выяснить в каких временных точках (5, 10, 20, 30 минут) наблюдается значимое увеличение. Так как мы будем проводить сравнение только с контролем, и число степеней свободы остаточной дисперсии $v_e = (n - 1)(m - 1) = 16$, то при критическом уровне значимости $\alpha = 0,05$ $t_{кр.16;0,05/4} = 2,813$. Тогда

$$\begin{aligned} t_1 &= \frac{x_{2\bullet} - x_{1\bullet}}{\sqrt{\frac{2s_e^2}{5}}} = \frac{3,9 - 3,3}{\sqrt{\frac{2 \cdot 0,015}{5}}} = \\ &= \frac{0,6}{\sqrt{\frac{0,03}{5}}} = \frac{0,6}{0,0775} = 7,742 > 2,813; \\ t_2 &= 0,4/0,0775 = 5,161 > 2,813; \\ t_3 &= 0,2/0,0775 = 2,581 < 2,813; \\ t_4 &= 0,1/0,0775 = 1,290 < 2,813. \end{aligned}$$

На основании проведённого анализа можно сделать заключение о том, что изучаемый препарат в течение первых 10 минут после введения статистически значимо увеличивает объёмную скорость коронарного кровотока.

Benjamini Y and Hochberg Y предложили модификацию поправки для множественных сравнений [8, 9]. Согласно этому методу, полученные в результате сравнения 2 выборок ошибки первого рода p_j ($j = 1, 2, \dots, k$, где k — количество сравнений) упорядочиваются по нарастанию. Для каждого сравнения рассчитывается величина:

$$\alpha' = \frac{j^* \alpha}{k}, \quad (90)$$

где α — принятый критический уровень значимости. Если

$$p_j \leq \alpha' = \frac{j^* \alpha}{k}, \quad (91)$$

различия считаются значимыми при критическом уровне α . Этот критерий обладает несколько большей мощностью, чем критерий с поправкой Бонферрони.

Пример 7. Используем данные примеров 4 и 6. С помощью программы «Biostat» рассчитаем точные значения вероятности ошибки первого рода и упорядочим их по нарастанию (табл. 7). Критический уровень значимости $\alpha = 0,05$.

Таблица 7

Пример множественных сравнений по *Benjamini Y and Hochberg Y* [8, 9]

Table 7

Example of multiple comparisons by *Benjamini Y and Hochberg Y* [8, 9]

Время после введения в-ва, мин	p	j	$\alpha' = \frac{j\alpha}{k}$
5	0,000001	1	0,0125
10	0,000095	2	0,0250
20	0,020101	3	0,0375
30	0,215	4	0,05

Таким образом, при применении поправки по *Benjamini Y and Hochberg Y* изменения, вызываемые препаратом, значимы в течение 20 минут.

Одним из наиболее распространённых критериев множественных сравнений является критерий Ньюмена–Кейлса [1, 7, 10], который обладает значительной большей мощностью, чем критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Однако этот метод применяется только для попарного сравнения всех изучаемых выборок.

Алгоритм расчёта этого критерия следующий: после проведения дисперсионного анализа, если нулевая гипотеза о равенстве всех средних отвергается, полученные средние упорядочивают по нарастанию и вычисляют значения критерия Ньюмена–Кейлса для всех пар средних:

$$q = \frac{x_{j\bullet} - x_{i\bullet}}{\sqrt{\frac{s_e^2}{2} \left(\frac{n_i + n_j}{n_i n_j} \right)}}, \quad (92)$$

где i, j — номера выборок, расположенных по нарастанию средних, $i < j$.

Вычисленное значение q сравнивают с соответствующим критическим значением, которое зависит от истинного уровня значимости α' (вероятности ошибочно обнаружить различия хотя бы в одной из сравниваемых пар), числа степеней свободы остаточной вариации и величины l , которая называется интервалом 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 $l = 7 - 2 + 1 = 6$.

Сравнение средних проводят в определённом порядке: сначала сравнивают наибольшее (m -е) среднее с наименьшим (1-м), затем m -е со 2-м и т. д. до $m-1$ -го. Затем предпоследнее значение с 1-м, 2-м и т. д. Если какие-то средние статистически значимо не различаются, то все средние, лежащие между ними также не различаются.

Пример 8. Используем данные примеров 1, но в отличие от примера 5 проведём попарное сравнение всех выборок. Так как однофакторный дисперсионный анализ показал статистически значимое влияние фактора «препарат», с помощью критерия Ньюмена–Кейлса проведём попарное сравнение выборок. В каждом сравнении: нулевая гипотеза — 2 выборки не различаются; альтернативная гипотеза — выборки различны. Упорядочим средние арифметические выборок по нарастанию: $AD_A = 172$ мм рт.ст.; $AD_B = 184$ мм рт.ст.; $AD_K = 190$ мм рт.ст. (нижние индексы коды препаратов, К — контроль); $s_e^2 = 15,9$. Рассчитаем показатели критерия q :

$$q_{AK} = \frac{190 - 172}{\sqrt{\frac{15,9}{2} \cdot \frac{5+7}{5 \cdot 7}}} = 10,903;$$

$$q_{AB} = \frac{184 - 172}{\sqrt{\frac{15,9}{2} \cdot \frac{6+7}{6 \cdot 7}}} = 7,650;$$

$$q_{BK} = \frac{190 - 184}{\sqrt{\frac{15,9}{2} \cdot \frac{6+5}{6 \cdot 5}}} = 3,514.$$

Сравним полученные в результате расчётов данные с показателями таблицы [1, 7] (в данной работе не приводится) при числе степеней свободы $v_e = 15$ и $l_{AK} = 3$, $l_{AB} = 2$, $l_{BK} = 2$: $q_{AK} = 10,903 > q_{15;3;0,01} = 4,836$; $q_{AB} = 7,650 > q_{15;2;0,01} = 4,168$; $q_{BK} = 3,514 > q_{15;2;0,05} = 3,014$. Таким образом, во всех трёх случаях мы отвергаем нулевую гипотезу и принимаем альтернативную (при сравнении выборок АК и АВ $p < 0,01$; выборки ВК — $p < 0,05$).

Для сравнения нескольких опытных выборок с контрольной группой может быть применен критерий Даннета [1, 7, 10], который является вариантом критерия Ньюмена–Кейлса. Рассчитывается показатель Даннета следующим образом:

$$q' = \frac{|x_{contr} - x_i|}{\sqrt{s_e^2 \frac{n_{contr} + n_i}{n_{contr} n_i}}}, \quad (93)$$

где i — номер выборки, которые упорядочивают по абсолютной величине их отличия от контрольной группы. Сравнение контрольной выборки с остальными начинают с группы, наиболее отличной от контроля. Рассчитанный показатель q' сравнивают с соответствующим критическим значением [1, 7, 11]

(таблица в данной статье не приводится), которое зависит от истинного уровня значимости α' (вероятности ошибочно обнаружить различия хотя бы в одной из сравниваемых пар), числа степеней свободы остаточной вариации и величины l , которая в данном случае равна числу групп, включая контрольную (В случае применения одностороннего критерия используют критическое значение для уровня $2\alpha'$). Если различия с очередной группой статистически незначимы, вычисления можно прекратить.

Пример 9. Применим критерий Даннета к данным, приведённым в примере 4. Средние величины коронарного кровотока, начиная с контрольной, равны: 3,3; 3,9; 3,7; 3,5; 3,4 мл/мин. Остаточная дисперсия — 0,015, число степеней свободы — 16, $l = 5$; $q'_{кр, 16, 5, 0,05} = 2,71$. Рассчитаем показатели критерия Даннета:

$$q'_1 = \frac{|3,3 - 3,9|}{\sqrt{0,015 \cdot 2/5}} = 7,746 > 2,71;$$

$$q'_2 = \frac{|3,3 - 3,7|}{\sqrt{0,015 \cdot 2/5}} = 5,164 > 2,71;$$

$$q'_3 = \frac{|3,3 - 3,5|}{\sqrt{0,015 \cdot 2/5}} = 2,582 < 2,71.$$

Таким образом, препарат статистически значимо ($p < 0,05$) увеличивает коронарный кровоток в течение 10 минут после введения.

Критерий Шеффе является достаточно простым [3, 4, 7]. Критерий статистической значимости между средними выборок рассчитывают по следующей формуле:

$$F = \frac{|\bar{x}_i - \bar{x}_j|}{\sqrt{s_e^2}} \sqrt{\frac{n_i n_j}{n_i + n_j}}, \quad (94)$$

где i, j — номера выборок, $i \neq j$, $\bar{x}$ — средняя арифметическая выборки.

Нулевую гипотезу отвергают, если

$$F \geq \sqrt{(m-1)F_{(m-1), (N-m), \alpha}}, \quad (95)$$

где m — число градаций фактора; N — объём дисперсионного комплекса; α — уровень значимости.

Пример 10. Применим критерий Шеффе к данным примера 2 (см. табл. 3):

$$F_{11,12} = \frac{|88,8 - 90,2|}{\sqrt{15,875}} \sqrt{\frac{5 \cdot 5}{5+5}} = 0,56 < \sqrt{3 \cdot F_{3,16;0,05}} = \sqrt{3 \cdot 3,24} = 3,12;$$

$$F_{11,21} = \frac{|88,8 - 62,4|}{\sqrt{15,875}} \sqrt{\frac{5 \cdot 5}{5+5}} = 10,48 > \sqrt{3 \cdot F_{3,16;0,05}} = \sqrt{3 \cdot 3,24} = 3,12;$$

$$\begin{aligned}
 F_{11,22} &= \frac{|88,8 - 71,6|}{\sqrt{15,875}} \sqrt{\frac{5 \cdot 5}{5+5}} = \\
 &= 6,83 > \sqrt{3 \cdot F_{3,16;0,05}} = \sqrt{3 \cdot 3,24} = 3,12; \\
 F_{12,21} &= \frac{|90,2 - 62,4|}{\sqrt{15,875}} \sqrt{\frac{5 \cdot 5}{5+5}} = \\
 &= 11,03 > \sqrt{3 \cdot F_{3,16;0,05}} = \sqrt{3 \cdot 3,24} = 3,12; \\
 F_{12,22} &= \frac{|90,2 - 71,6|}{\sqrt{15,875}} \sqrt{\frac{5 \cdot 5}{5+5}} = \\
 &= 7,38 > \sqrt{3 \cdot F_{3,16;0,05}} = \sqrt{3 \cdot 3,24} = 3,12; \\
 F_{21,22} &= \frac{|62,4 - 71,6|}{\sqrt{15,875}} \sqrt{\frac{5 \cdot 5}{5+5}} = \\
 &= 3,65 > \sqrt{3 \cdot F_{3,16;0,05}} = \sqrt{3 \cdot 3,24} = 3,12.
 \end{aligned}$$

Таким образом, в условиях инфаркта миокарда фракция выброса статистически значимо понижается. Изучаемый препарат увеличивает фракцию выброса, но только в условиях инфаркта миокарда.

Представление результатов, полученных с помощью классического дисперсионного анализа и методов множественных сравнений. Полученные результаты можно описать двумя разными способами:

1. Средние арифметические по выборкам и их стандартные ошибки, рассчитанные с использованием остаточной дисперсии, полученной в результате дисперсионного анализа

$$s_{x_{i\bullet}} = \sqrt{\frac{s_e^2}{n_i}}, \quad (96)$$

где i — номер выборки.

2. Доверительные интервалы разностей средних, которые рассчитываются следующим образом. Сначала рассчитывают среднюю ошибку разности средних

$$s_{\Delta_{ij}} = \sqrt{\frac{s_e^2}{n_i} + \frac{s_e^2}{n_j}}, \quad (97)$$

где i, j — номера выборок.

Затем вычисляют границы доверительного интервала для разности средних значений в двух группах ($\Delta_{ij} = x_{\bullet i} - x_{\bullet j}$): $(\Delta_{ij} - t \cdot s_{\Delta_{ij}})$; $(\Delta_{ij} + t \cdot s_{\Delta_{ij}})$, где t — значение t -критерия для числа степеней свободы $(n_i + n_j - 2)$ и выбранного уровня значимости. При этом обязательно указываются результаты дисперсионного анализа: факториальные и остаточная дисперсии, число степеней свободы, показатели силы влияния факторов, величины F и p [12].

Если допущения, необходимые для проведения классического дисперсионного анализа, не выполняются, могут быть использованы его непараметрические аналоги, разобранные в статье [13].

Дисперсионный анализ был модифицирован для обработки данных измеренных в категориальных (номинальных) шкалах. К сожалению, эта модификация не разработана в программных статистических пакетах.

Дисперсионный анализ качественных признаков. Признаки, которые измеряют с помощью категориальных (дихотомических) шкал достаточно часто встречаются при проведении фармакологических исследований. Иногда очень полезным оказывается переход от количественной шкалы к качественной. Результаты такого рода экспериментов описывают с помощью выборочной абсолютной (m из n) или относительной частоты события ($\bar{p}$):

$$\bar{p} = \frac{m}{n}, \quad (98)$$

где m — число появлений интересующего нас события в n независимых испытаниях.

Относительная частота и теоретическая вероятность появления изучаемого события не обязательно будут полностью совпадать, однако с увеличением числа экспериментов до бесконечности отклонение относительной частоты от теоретической вероятности будет стремиться к нулю.

При двух альтернативах такие явления часто соответствуют биномиальному распределению. Как и любое распределение, оно характеризуется специфическими параметрами. Первый из них (μ) определяет наиболее вероятное число появлений ожидаемого результата в n независимых событиях:

$$\mu = np. \quad (99)$$

Другим параметром этих распределений является вариация, которая характеризует меру неопределённости. В случае биномиального распределения оценивается по формуле:

$$S = np(1 - p). \quad (100)$$

При достаточно больших объёмах выборок ($np(1 - p) > 9$) и $0,3 \leq p \leq 0,7$ такого рода данные хорошо аппроксимируются нормальным распределением, что даёт возможность применять для обработки критерии, основанные на этом распределении [4, 5, 7, 14].

При обработке нескольких подобных выборок (что обычно и случается при изучении новых веществ) исследователи проводят попарное сравнение выборок без учёта множественности сравнений, т. е. допускают грубейшую ошибку. Далее мы рассмотрим применение дисперсионного анализа для обработки подобных данных.

Однофакторный дисперсионный анализ качественных признаков. В своей «классической» форме дисперсионный анализ был разработан Р.Фишером для анализа количественных признаков, подчиняющихся нормальному закону распределения. Вторым условием применения этого метода является сходный уровень вариабельности зависимой переменной в пределах

каждой градации. Для качественных признаков дисперсионный анализ используется мало. Вместо него при сравнении нескольких выборок используют критерий хи-квадрат. Однако в отличие от хи-квадрата дисперсионный анализ даёт возможность определить не только статистическую значимость проверяемой гипотезы, но и позволяет оценить силу влияния изучаемых факторов и их взаимодействие.

Также как и в «классическом» случае, дисперсионный анализ качественных признаков основан на разложении суммарной вариации (S_g) на составляющие компоненты – факториальную (S_f) и остаточную (S_e) и определения значимости различий между этими компонентами.

Наиболее важными условиями применимости дисперсионного анализа качественных признаков являются достаточно большие объёмы выборок и равенство их объёмов или, по крайней мере, близость (один порядок).

В основе однофакторного дисперсионного анализа категориальных признаков лежит ранее указанное правило разложения вариации:

$$S_g = S_f + S_e, \quad (101)$$

Предположим, у нас есть k выборок, объём каждой из которых составляет n_i (где $1 \leq i \leq k$), число организмов с интересующей нас реакцией (признаком) в каждой группе равно m_i . Тогда общая вариация дисперсионного комплекса будет равна:

$$S_g = N \cdot \hat{p}(1 - \hat{p}), \quad (102)$$

где

$$N = \sum_{i=1}^k n_i \quad (103)$$

суммарный объём дисперсионного комплекса; $\hat{p}$ — средняя взвешенная частота реакции (признака) для всего комплекса:

$$\hat{p} = \frac{\sum_{i=1}^k m_i}{N}. \quad (104)$$

Формулу общей вариации можно преобразовать и получить следующее выражение:

$$S_g = \sum_{i=1}^k m_i - \frac{\left(\sum_{i=1}^k m_i\right)^2}{N}. \quad (105)$$

Факториальная вариация, отражающая изменчивость между выборками, может быть рассчитана по формуле:

$$S_f = \sum_{i=1}^k \frac{m_i^2}{n_i} - \frac{\left(\sum_{i=1}^k m_i\right)^2}{N}. \quad (106)$$

Остаточную вариацию, отражающую внутривыборочную вариабельность, рассчитывают следующим образом:

$$S_e = S_g - S_f = \sum_{i=1}^k m_i - \sum_{i=1}^k \frac{m_i^2}{n_i} = \sum_{i=1}^k n_i \bar{p}_i (1 - \bar{p}_i), \quad (107)$$

где $\bar{p}$ — относительная частота признака (реакции) в i -ой выборке.

Разделив полученные вариации на соответствующее число степеней свободы ($v_g = N - 1$; $v_f = k - 1$; $v_e = N - k$), мы получим дисперсии:

$$s_g^2 = \frac{S_g}{N - 1}; \quad (108)$$

$$s_f^2 = \frac{S_f}{k - 1}; \quad (109)$$

$$s_e^2 = \frac{S_e}{N - k}. \quad (110)$$

Статистическую значимость влияния изучаемого фактора можно оценить с помощью дисперсионного отношения:

$$F = \frac{s_f^2}{s_e^2}, \quad (111)$$

которое имеет F -распределение Фишера — Снедекора. Если рассчитанный показатель

$$F \geq F_{v_f, v_e, \alpha}, \quad (112)$$

где α -критический уровень значимости, то нулевая гипотеза об отсутствии влияния фактора отвергается в пользу альтернативной [5, 14].

Используя полученные данные, можно рассчитать показатель силы влияния фактора (h_f^2) и его ошибку ($s_{h_f^2}$):

$$h_f^2 = \frac{S_f}{S_g}; \quad (113)$$

$$s_{h_f^2} = (1 - h_f^2) \frac{v_f}{v_e}, \quad (114)$$

где $v_f = k - 1$; $v_e = N - k$.

Статистическую значимость показателя силы влияния фактора рассчитывают с помощью распределения Фишера — Снедекора:

$$F = \frac{h_f^2}{s_{h_f^2}}, \quad (115)$$

если рассчитанное $F \geq F_{v_f, v_e, \alpha}$, то на уровне $p \leq \alpha$ нулевую гипотезу $h_f^2 = 0$ отвергают в пользу альтернативной. Доверительный интервал $P(1 - \alpha)$ показателя

силы влияния фактора можно рассчитать следующим образом [5]:

$$h_f^2 - s_{h_f^2} F_{v_f, v_e, \alpha} \div h_f^2 + s_{h_f^2} F_{v_f, v_e, \alpha}. \quad (116)$$

После проведения дисперсионного анализа часто возникает необходимость выяснить статистическую значимость различий между частотами проявления признака (реакции) при различных градациях изучаемого фактора. С этой целью можно использовать следующий метод. Так как хорошо известно, что квадрат квантиля распределения Стьюдента с числом степеней свободы v равен квантилю распределения Фишера — Снедекора с числом степеней свободы 1 и v ($F_{1, v, \alpha} = t_{v, \alpha}^2$), то для расчёта статистической значимости различий между двумя долями в условиях множественности сравнений можно использовать соотношение:

$$F = \frac{(\bar{p}_i - \bar{p}_j)^2}{s_e^2} \frac{n_i n_j}{n_i + n_j}, \quad (117)$$

где i, j — номера выборок, $i \neq j$.

Если $F \geq F_{1, v_e, \alpha}$, (где $v_e = N - k$, α определяют с учётом поправки Бонферрони), то нулевую гипотезу о равенстве долей следует отвергнуть в пользу альтернативной [5].

Пример 11. На свиноводческом комплексе проводили испытания нового антигельминтного средства в сравнении препаратом Вермокс. Было сформировано три группы животных по 60 голов в каждой: 1 — контроль (плацебо); 2 — Вермокс; 3 — препарат X. Заражённость аскаридами составляла 75 % (по 45 голов в каждой группе). После курса лечения вновь проверили заражённость аскаридами (табл. 8). По полученным результатам необходимо было определить эффективность изучаемых препаратов. Нулевая гипотеза — заражённость аскаридами в выборках не различается. Альтернативная гипотеза — заражённость аскаридами в выборках различна. Критический уровень значимости $\alpha = 0,05$:

$$F = \frac{s_f^2}{s_e^2} = \frac{3,15}{0,216} = 14,583 = F_{2;177;0,000001}.$$

Таким образом, нулевую гипотезу об отсутствии эффекта изучаемых препаратов следует отвергнуть на уровне $p = 0,000001$.

Рассчитаем показатель силы влияния фактора и его ошибку:

$$h_f^2 = \frac{S_f}{S_g} = \frac{6,30}{44,55} = 0,141;$$

$$s_{h_f^2} = \left(1 - h_f^2\right) \frac{k - 1}{N - k} = (1 - 0,141) \frac{2}{177} = 0,010.$$

Таблица 8

Пример однофакторного дисперсионного анализа категориальных данных

Table 8

Example of one-factor analysis of variance of categorical data

Показатель	Контроль	Вермокс	Препарат X
n	60	60	60
m	45	36	18
m^2/n	33,75	21,60	5,40
$\bar{p} = m/n$	0,75	0,60	0,30
$S_g = \sum_{i=1}^k m_i - \frac{\left(\sum_{i=1}^k m_i\right)^2}{N} = \frac{99 - 9801}{180} = 44,55$			
$S_f = \sum_{i=1}^k \frac{m_i^2}{n_i} - \frac{\left(\sum_{i=1}^k m_i\right)^2}{N} = 60,75 - 54,45 = 6,30$			
$S_e = S_g - S_f = \sum_{i=1}^k m_i - \sum_{i=1}^k \frac{m_i^2}{n_i} = 38,25$			
$v_g = N - 1 = 179; v_f = k - 1 = 2; v_e = N - k = 177$			
$s_g^2 = \frac{S_g}{v_g} = \frac{44,55}{179} = 0,249; s_f^2 = \frac{6,30}{2} = 3,15; s_e^2 = \frac{38,25}{177} = 0,216$			

Определим статистическую значимость показателя силы влияния фактора:

$$F = \frac{h_f^2}{s_{h_f^2}} = \frac{0,141}{0,010} = 14,1 = F_{2;177;0,000002}.$$

Следовательно, влияние изучаемого фактора (антигельминтных средств) определяет 14,1 % общей вариации комплекса и является статистически значимым при $p = 0,000002$.

Теперь необходимо выявить разницу между отдельными градациями фактора.

$$F = \frac{(\bar{p}_1 - \bar{p}_2)^2}{s_e^2} \frac{n}{2} = \frac{(0,75 - 0,60)^2}{0,216} \frac{60}{2} = 3,125 = F_{1;177;0,0788};$$

$$F = \frac{(\bar{p}_1 - \bar{p}_3)^2}{s_e^2} \frac{n}{2} = \frac{(0,75 - 0,30)^2}{0,216} \frac{60}{2} = 28,125 = F_{1;177;0,000000};$$

$$F = F = \frac{(\bar{p}_2 - \bar{p}_3)^2}{s_e^2} \frac{n}{2} = \frac{(0,60 - 0,30)^2}{0,216} \frac{60}{2} = 12,500 = F_{1;177;0,000519}.$$

Таким образом, при сравнении Вермокса с контролем следует принять нулевую гипотезу о неэффективности препарата при $p = 0,236$ (с учётом поправки Бонферрони). Сравнивая препарат X с контролем следует отвергнуть нулевую гипотезу и принять альтернативную о высокой эффективности лекарственного средства ($p < 0,00001$). Препарат значительно более эффективен, чем Вермокс (с учётом поправки Бонферрони $p = 0,00156$).

Двухфакторный дисперсионный анализ качественных признаков. В основе двухфакторного дисперсионного анализа категориальных признаков лежит всё тот же закон разложения суммарной вариации. Однако он несколько усложняется. Также как в случае количественных переменных факториальная вариация сама уже разлагается на 3 компонента: $S_f = S_A + S_B + S_A \cdot S_B$. Так же как в случае однофакторного анализа для проведения двухфакторного дисперсионного анализа категориальных признаков требуются достаточно большие равновеликие или пропорциональные выборки. Алгоритм двухфакторного дисперсионного анализа качественных признаков можно описать следующим образом.

Допустим мы имеем большую группу N животных (независимых испытаний), на которых воздействуют два независимых фактора A и B при количестве градаций a и b , соответственно. Тогда количество изучаемых выборок будет равно $a \cdot b$, в каждой выборке n_{ij} животных и m_{ij} реакций на воздействие, где $i = 1, \dots, a$, $j = 1, \dots, b$. Рассчитаем вариации.

Суммарная (общая) вариация равна:

$$S_g = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b m_{ij} - \frac{\left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b m_{ij} \right)^2}{N}. \quad (118)$$

Остаточная (случайная) вариация:

$$S_e = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b m_{ij}^2 - \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \frac{m_{ij}^2}{n_{ij}}. \quad (119)$$

Общая факториальная вариация будет равна:

$$S_f = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \frac{m_{ij}^2}{n_{ij}} - \frac{\left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b m_{ij} \right)^2}{N}. \quad (120)$$

Вариация, обусловленная фактором A :

$$S_{fA} = \sum_{i=1}^a \frac{\left(\sum_{j=1}^b m_{ij} \right)^2}{\sum_{j=1}^b n_{ij}} - \frac{\left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b m_{ij} \right)^2}{N}. \quad (121)$$

Вариация, обусловленная фактором B :

$$S_{fB} = \sum_{j=1}^b \frac{\left(\sum_{i=1}^a m_{ij} \right)^2}{\sum_{i=1}^a n_{ij}} - \frac{\left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b m_{ij} \right)^2}{N}. \quad (122)$$

Вариация, обусловленная взаимодействием факторов:

$$S_{fAB} = S_f - S_{fA} - S_{fB}. \quad (123)$$

Определим число степеней свободы для всех рассмотренных вариаций:

$$\begin{aligned} v_g &= N - 1; \quad v_e = N - ab; \quad v_f = ab - 1; \\ v_{fA} &= a - 1; \quad v_{fB} = b - 1; \quad v_{fAB} = (a - 1)(b - 1). \end{aligned}$$

Теперь, зная вариации и число степеней свободы, следует рассчитать дисперсии, разделив общую и частные вариации на число степеней свободы:

$$\begin{aligned} s_g^2 &= \frac{S_g}{v_g}; \quad s_e^2 = \frac{S_e}{v_e}; \quad s_f^2 = \frac{S_f}{v_f}; \\ s_{fA}^2 &= \frac{S_{fA}}{v_{fA}}; \quad s_{fB}^2 = \frac{S_{fB}}{v_{fB}}; \quad s_{fAB}^2 = \frac{S_{fAB}}{v_{fAB}}. \end{aligned}$$

Используя рассчитанные дисперсии, определяют статистическую значимость влияния факторов. С этой целью делят общую и частные факториальные дисперсии на остаточную дисперсию. Полученные таким образом показатели F , имеют распределение Фишера-Снедекора. Если рассчитанный показатель $F \geq F_{v_f, \dots, v_e, \alpha}$, нулевую гипотезу об отсутствии влияния данного фактора отвергают и на критическом уровне значимости α принимают альтернативную гипотезу о том, что фактор изменяет частоту результирующего признака.

Показатели силы влияния факторов, их ошибку и статистическую значимость определяют также как в случае двухфакторного дисперсионного анализа количественных признаков [5, 14].

Пример 12. На 240 мышах изучали совместное радиопротекторное действие препаратов A и B . Показателем эффекта служила выживаемость в течение 1 недели после γ -облучения в течение 2 часов. Животные были разделены на 4 группы по 60 животных в каждой: 1) A1B1 — не получала препаратов; 2) A2B1 — мышам вводили только препарат A ; 3) A1B2 — животным вводили только препарат B ; 4) A2B2 — мыши получали оба препарата. Данные и алгоритм обработки представлены в табл. 9.

Нулевая гипотеза: препараты не влияют на выживаемость в условиях облучения; альтернативная гипотеза: выживаемость под влиянием хотя бы одного препарата увеличивается. Критический уровень значимости $\alpha = 0,05$.

Таблица 9

Пример обработки категориальных данных с помощью двухфакторного дисперсионного анализа

Table 9

Example of categorical data processing using two-factor analysis of variance

	A1		A2	
	B1	B2	B1	B2
n	60	60	60	60
m	15	21	30	42
m^2	225	441	900	1764
$\bar{p} = m/n$	0,25	0,35	0,50	0,70
S	$S_g = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b m_{ij} - \frac{\left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b m_{ij} \right)^2}{N} = 108 - \frac{11664}{240} = 59,4; \quad S_e = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b m_{ij} - \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \frac{m_{ij}^2}{n_{ij}} = 108 - 55,5 = 52,5;$ $S_f = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \frac{m_{ij}^2}{n_{ij}} - \frac{\left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b m_{ij} \right)^2}{N} = 55,5 - 48,6 = 6,9; \quad S_{fA} = \sum_{i=1}^a \frac{\left(\sum_{j=1}^b m_{ij} \right)^2}{\sum_{j=1}^b n_{ij}} - \frac{\left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b m_{ij} \right)^2}{N} = 54 - 48,6 = 5,4;$ $S_{fB} = \sum_{j=1}^b \frac{\left(\sum_{i=1}^a m_{ij} \right)^2}{\sum_{i=1}^a n_{ij}} - \frac{\left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b m_{ij} \right)^2}{N} = 49,95 - 48,6 = 1,35; \quad S_{fAB} = S_f - S_{fA} - S_{fB} = 6,9 - 5,4 - 1,35 = 0,15.$			
v	$v_g = N - 1 = 239; \quad v_e = N - ab = 236; \quad v_f = ab - 1 = 3; \quad v_{fA} = a - 1 = 1; \quad v_{fB} = b - 1 = 1; \quad v_{fAB} = (a - 1)(b - 1) = 1.$			
s_x^2	$s_g^2 = \frac{S_g}{v_g} = 0,249; \quad s_e^2 = \frac{S_e}{v_e} = 0,222; \quad s_f^2 = \frac{S_f}{v_f} = 2,3; \quad s_{fA}^2 = \frac{S_{fA}}{v_{fA}} = 5,4; \quad s_{fB}^2 = \frac{S_{fB}}{v_{fB}} = 1,35; \quad s_{fAB}^2 = \frac{S_{fAB}}{v_{fAB}} = 0,15.$			

На основании данных табл. 9 рассчитаем

$$F_f = 2,3/0,222 = 10,360 = F_{3;236;0,000002};$$

$$F_{fA} = 5,4/0,222 = 24,324 = F_{1;236;0,000002};$$

$$F_{fB} = 1,35/0,222 = 6,081 = F'_{1;236;0,014};$$

$$F_{fAB} = 0,15/0,222 = 0,676 = F'_{1;236;0,59}.$$

Таким образом нулевая гипотеза в отношении препаратов A и B отвергается в пользу альтернативной, которая утверждает, что вещества статистически значимо увеличивают выживаемость в условиях облучения. Однако взаимодействие между этими веществами отсутствует, т. е. эффект одного препарата не зависит от другого.

Теперь рассчитаем показатели силы влияния факторов и их ошибки:

$$h_f^2 = \frac{S_f}{S_g} = \frac{6,90}{59,40} = 0,116; \quad s_{h_f^2} = v_f \frac{\eta_e}{v_e} = 3 \cdot \frac{0,884}{236} = 0,011;$$

$$h_{fA}^2 = \frac{S_{fA}}{S_g} = \frac{5,40}{59,40} = 0,091; \quad s_{h_{fA}^2} = v_{fA} \frac{\eta_e}{v_e} = 1 \cdot \frac{0,884}{236} = 0,004;$$

$$h_{fB}^2 = \frac{S_{fB}}{S_g} = \frac{1,35}{59,40} = 0,023; \quad s_{h_{fB}^2} = v_{fB} \frac{\eta_e}{v_e} = 1 \cdot \frac{0,884}{236} = 0,004;$$

$$h_{fAB}^2 = \frac{S_{fAB}}{S_g} = \frac{0,15}{59,40} = 0,0025;$$

$$s_{\eta_{fAB}}^2 = v_{fAB} \frac{\eta_e}{v_e} = 1 \cdot \frac{0,884}{236} = 0,004;$$

$$\eta_e = \frac{S_e}{S_g} = \frac{52,5}{59,4} = 0,884.$$

Таким образом, контролируемые факторы определяют 11,6 % вариации, из них фактор A — 9,1 %, а фактор B — 2,3 %.

Определим статистическую значимость показателей силы влияния факторов:

$$F = \frac{h_f^2}{s_{h_f^2}} = \frac{0,116}{0,011} = 10,545 = F_{3;236;0,000002};$$

$$F = \frac{h_{fA}^2}{s_{h_{fA}^2}} = \frac{0,091}{0,004} = 22,75 = F_{1;236;0,000002};$$

$$F = \frac{h_{fB}^2}{s_{h_{fB}}^2} = \frac{0,023}{0,004} = 5,75 = F_{1;236;0,014};$$

$$F = \frac{\eta_{fAB}}{s_{\eta_{fAB}}^2} = \frac{0,0025}{0,004} = 0,625 = F_{1;236;0,43}.$$

Таким образом, показатели силы влияния факторов *A* и *B* являются статистически значимыми. Однако их взаимодействие отсутствует.

Итак, мы разобрали дисперсионный анализ данных, измеренных в количественных и категориальных шкалах. Данный метод является мощным средством анализа и даёт возможность выявить не только различия между выборками, но определить мощность действия 2 и более факторов и их взаимодействие.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Цорин Иосиф Борисович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: tsorinib@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/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, Российская Федерация

Tsorin Iosif B.

Corresponding author

e-mail: tsorinib@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>

SPIN code: 4015-3025

Dr. Sci. (Biology), Leading researcher of laboratory of pharmacological screening, FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М., Практика, 1998. 459 с. [Glantz St.A. Primer of biostatistics. Fourth Edition. McGraw-Hill: Health Professions Division. New York; 1994. (In Russ).].
2. Fisher RA. Statistical methods for research workers — Oliver&boyd, Edinburgh, 1925. 149 p.
3. Шеффе Г. Дисперсионный анализ. М.: «Наука». Главная редакция физико-математической литературы. 1980. 512 с. [Scheffe H. The analysis of variance. New York: John Wiley&Sons Inc. 1958. (In Russ).].
4. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа; 1990. 352 с. [Lakin GF. Biometriya: Study guide for biol. spec. universities. 4th ed., reprint. and add. Moscow: "Vyshaya shkola"; 1990. (In Russ).].
5. Плохинский Н.А. Биометрия. 2-е изд. М.: Изд-во Московского Университета; 1970. 367 с. [Plohinskij NA. Biometriya. Izdanie 2-e. Moscow: «Izdatel'stvo Moskovskogo Universiteta»; 1970. (In Russ).].
6. Куликов Е.И. Прикладной статистический анализ : учебное пособие для студентов высших учебных заведений / Е. И. Куликов. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Горячая линия-Телеком; 2008. 463 с. [Kulikov EI. Prikladnoj statisticheskiy analiz : uchebnoe posobie dlya studentov vysshih uchebnyh zavedenij / Kulikov EI. 2nd ed., reprint. and additional. M.: "Goryachaea liniya- Telecom"; 2008. (In Russ).].
7. Кобзарь А. И. Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников. М.: Физматлит, 2006. 816 с. [Kobzar AI. Prikladnaya matematicheskaya statistika. Dlya inzhenerov i nauchnyh rabotnikov. Moscow: Fizmatlit; 2006. (In Russ).].
8. Hochberg Y, Benjamini Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med*. 1990 Jul;9(7):811–818. DOI: 10.1002/sim.4780090710.
9. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: practical and powerful approach to multiple testing. *J.R. Statist. Soc. B*. 1995; 57(1):289–300.
10. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2006. 304 с. [Sergienko VI, Bondareva IB. Matematicheskaya statistika v klinicheskikh issledovaniyakh 2nd ed., reprint. and add. Moscow: GEOTAR-Medi. 2006. (In Russ).].
11. Dannet CW. New tables multiple comparisons with control. *Biometrics*. 1964;20:482–491.
12. Ланг Т.А., Сесик М. Как описывать статистику в медицине. М.: Практическая медицина. 2011. 480 с. [Lang TA, Sesik M. Prikladnoj statisticheskiy analiz : uchebnoe posobie dlya studentov vysshih uchebnyh zavedenij / Kulikov EI. 2nd ed., reprint. and additional. Moscow: "Goryachaea liniya- Telecom"; 2008. (In Russ).].
13. 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):3–24. [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. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-3-3-24.
14. Крамаренко С.С. Дисперсионный анализ качественных признаков. Крымский малакологический сайт. 2006. [Kramarenko SS. Dispersionnyy analiz kachestvennykh priznakov. Krymskiy malakologicheskij sajt. 2006. URL: http://www.malacology.narod.ru/download/kramarenko_2006_disp.html

Изучение возможности коррекции поведенческих нарушений у крыс со стереотаксической моделью болезни Альцгеймера

Сёмина И. И.¹, Малиновская Н. А.², Никитин Д. О.¹, Никитина А. В.¹, Семёнова А. А.²

¹ — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Казань, Российская Федерация

² — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, Российская Федерация

Аннотация. Актуальность. Болезнь Альцгеймера (БА) — нейродегенеративное заболевание, лекарственная терапия которого способна лишь замедлить прогрессирование болезни, что обусловлено многообразием имеющихся патогенетических процессов. Возможным эффективным подходом к коррекции симптомов может стать применение соединений с комплексным механизмом действия — фосфорилацетогидразидов, способных одновременно воздействовать на разные звенья патологического процесса, наиболее эффективным представителем которых является соединение 2-хлорэтокси-пара-N-диметиламинофенил фосфорилацетогидразид (КАПАХ). Цель. Изучить возможность коррекции когнитивных и поведенческих нарушений у крыс со стереотаксической моделью БА с использованием соединения КАПАХ, воздействующего на разные звенья патологического процесса. Методы. В работе были использованы 24 самки крыс линии Wistar. БА моделировали у крыс путём стереотаксического билатерального введения в область гиппокампа β -амилоида в растворе фосфатного буфера, затем на 11-й день внутрибрюшинно вводили КАПАХ (10 мг/кг) в течение 10 дней, после чего проводили тестирование на установках «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Открытое поле» и «Водный лабиринт Морриса». Статистическую обработку осуществляли в программе GraphPad Prism 8.0.1 с применением однофакторного анализа ANOVA. Результаты. Многократное введение КАПАХ способствовало снижению уровня тревожности в методе «Приподнятый крестообразный лабиринт», увеличивая время пребывания в открытых «рукавах» в 4,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с крысами без лечения. В тестах «Водный лабиринт Морриса» и «Открытое поле» наблюдалась нормализация процессов памяти и двигательной активности, соответственно, время поиска платформы и количество пересечённых линий не отличались от показателей контрольных животных. Вывод. КАПАХ уменьшает состояние тревожности и процессы памяти у крыс со стереотаксической моделью болезни Альцгеймера, вызванной введением β -амилоида в область гиппокампа.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера; бета-амилоид; Открытое поле; Приподнятый крестообразный лабиринт; Водный лабиринт Морриса

Для цитирования:

Сёмина И. И., Малиновская Н. А., Никитин Д. О., Никитина А. В., Семёнова А. А. Изучение возможности коррекции поведенческих нарушений у крыс со стереотаксической моделью болезни Альцгеймера. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(1):24–32. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-24-32>

Поступила: 20 февраля 2023 г. **Принята:** 26 февраля 2023 г. **Опубликована:** 24 марта 2023 г.

Study of the possibility of correcting behavioral disorders in rats with a stereotaxic model of Alzheimer's disease

Semina II¹, Malinovskaya NA², Nikitin DO¹, Nikitina AV¹, Semenova AA²

¹ — Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kazan Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation

² — Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Relevance. Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease, the drug therapy of which can only slow the progression of the disease, due to the variety of existing pathogenetic processes. A possible effective approach to the correction of symptoms can be the use of compounds with a complex mechanism of action — phosphorylaceto hydrazides, capable of simultaneously acting on different parts of the pathological process, the most effective representative of which is the compound 2-chloroethoxy-para-N-dimethylaminophenyl phosphorylaceto hydrazide (CAPAH). Target. To study the possibility of correcting cognitive and behavioral disorders in rats with a stereotaxic model of AD using the CAPAH compound, which affects different parts of the pathological process. Methods. 24 female Wistar rats were used in the work. AD was modeled in rats by stereotaxic bilateral injection of β -amyloid into the hippocampal region in a phosphate buffer solution, then on day 11, CAPAH (10 mg/kg) was administered intraperitoneally for 10 days, after which tests were performed using the «Elevated Plus Maze», «Open Field» and «Morris Water Maze». Statistical processing was carried out in the GraphPad Prism 8.0.1 program using one-way ANOVA analysis. Results. Multiple administration of CAPAH contributed to a decrease in the level of anxiety in the «Elevated Plus Maze» method, increasing the time spent in open arms by 4.6 times ($p < 0.05$) compared to rats without treatment. In the «Morris Water Maze» and «Open Field» tests, normalization of memory and motor activity processes was observed, respectively, the platform search time and the number of crossed lines did not differ from those of control animals. Conclusion. CAPAH reduces anxiety and memory processes in rats with a stereotaxic model of Alzheimer's disease caused by the introduction of β -amyloid into the hippocampus.

Keywords: Alzheimer's disease; beta-amyloid; Open field; Elevated plus maze; Morris water maze

For citations:

Semina II, Malinovskaya NA, Nikitin DO, Nikitina AV, Semenova AA. Study of the possibility of correcting behavioral disorders in rats with a stereotaxic model of Alzheimer's disease. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(1):24–32. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-24-32>

Received: February 20, 2023. **Accepted:** February 26, 2023. **Published:** March 24, 2023.

Введение / Introduction

Как известно, болезнь Альцгеймера (БА) — хроническое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся нарушениями процессов памяти и когнитивных функций с последующим развитием деменции, увеличением общего уровня тревожности и неадекватным социальным поведением [1–3]. В настоящее время, наряду с онкологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями, БА является одной из самых распространённых патологий в мире [3, 4]. Из-за увеличения доли пожилого населения растёт не только число заболевших, но и скорость распространения: на сегодняшний день среди 50 миллионов случаев деменции во всём мире, БА занимает более 60 %. Согласно прогнозам, к 2050 году количество заболевших увеличится в 2–3 раза [4–7].

К сожалению, в патогенезе БА нет единой согласованной теории. Так, ряд исследователей выделяют важную роль тау-протеина, в норме выполняющего в клетке транспортные функции, а в случае БА образующего внутриклеточные нейрофибриллярные клубочки, приводящие к нарушению вышеуказанной функции и гибели клетки [7, 8]. Однако одной из самых общепризнанных и распространённых версий считается «амилоидная гипотеза», основанная на нарушении метаболизма белка-предшественника β -амилоида — APP (Amyloid precursor protein), что приводит к появлению сенильных бляшек в тканях мозга, основным элементом которых и является нейротоксический белок β -амилоид [7, 9, 10]. В пользу данного варианта свидетельствует тот факт, что по мере прогрессирования БА количество бляшек неуклонно увеличивается. Кроме того, считается, что именно образование амилоидных структур в межклеточном пространстве нервной ткани способно запустить гиперфосфорилирование тау-протеина, что в свою очередь приводит к цепи событий, вызывающих гибель большого количества нейронов [8, 10]. По мере развития заболевания наблюдаются каскадные изменения целого ряда структур: одновременное ухудшение функций практически всех нейротрансмиссивных систем, нарушение связи с вторичными посредниками, появление хронической нейровоспалительной реакции и запуск процессов апоптоза, изменение экспрессии ряда генов, а также нарушение синаптической пластичности [6, 8, 11, 12].

Существующие на данный момент лекарственные средства, применяемые в терапии БА, направлены в основном на коррекцию симптомов, часто сопряжены с широким спектром нежелательных лекарственных реакций и предполагают длительный, пожизненный приём [5, 6, 13]. Причиной подобной ситуации является как недостаточная изученность этиопатогенетических звеньев БА, так и широкое многообразие факторов, способствующих её развитию.

Подобная гетерогенность БА предполагает создание аналогичного, комплексного подхода к коррекции, и

возможным вариантом решения этого вопроса может стать применение соединений фосфорилацетогидразидов (ФАГ). Фосфорилацетогидразиды относятся к классу фосфорилированных карбоновых кислот — соединений на основе четырёхкоординированного атома фосфора, который способен содержать несколько функционально активных групп, каждая может иметь свою мишень в патологическом процессе [14, 15]. Ранее было показано, что, благодаря такой химической структуре, ФАГ имеют мультитаргетный механизм действия и способность корректировать функции важнейших для развития деменций нейротрансмиссивных систем [14, 16, 17]. Это позволило позиционировать наиболее перспективное производное ФАГ — соединение 2-хлорэтоксипара-N-диметиламинофенил фосфорилацетогидразид (КАПАХ), как потенциальное лекарственное средство с комплексным механизмом действия, способное улучшать функции мозга при деменциях и различных нарушениях памяти [15, 17, 18].

С целью адекватности прогноза трансляционных исследований по эффективности лекарственных средств в клинике необходим выбор оптимальных моделей БА на экспериментальных животных. Моделирование БА на животных позволяет получить как новые сведения о патогенезе, так и определить новые направления к коррекции.

Современная наука отдаёт предпочтение двум подходам к формированию БА на животных: стереотаксический и генно-модифицированный [10, 18, 19].

Метод стереотаксического формирования БА является более простым и менее дорогостоящим по сравнению с генно-модифицированным подходом и на первом этапе изучения может служить адекватной моделью для выявления эффективности потенциальных лекарственных средств. Стереотаксический метод основан на введении нейротоксических агентов в различные зоны головного мозга животных [10, 19, 20]. Наиболее распространённой считается модель, основанная на введении амилоидных фрагментов в мозг животных. При этом предпочтение отдаётся более длинноцепочечным формам ($A\beta$ 1-42), поскольку именно они обладают большей способностью к агрегации и нейротоксичностью [10, 18]. В этом случае β -амилоид вводят в область гиппокампа, являющегося центром консолидации памяти, уменьшение размеров которого служит одним из ранних диагностических признаков деменции. У животных наблюдаются прогрессирующая нейродегенерация с поведенческими расстройствами, нарушением процессов памяти и обучаемости [10, 18, 20].

Таким образом, учитывая изученную ранее способность КАПАХ оказывать влияние на функции нейромедиаторных систем, играющих ключевую роль в развитии деменций при БА, целью работы стало изучить его способность корректировать поведение крыс со стереотаксической моделью БА, вызванной введением β -амилоида.

Материалы и методы исследования / Materials and methods of research

В качестве объекта исследования использовалось перспективное соединение ряда ФАГ — КАПАХ: 2-хлорэтокси-пара-N-диметиламинофенил фосфорилацетогидразид (рис. 1). ФАГ представляют ряд соединений, содержащих четырёхкоординированный атом фосфора, который способен удерживать несколько функционально активных групп, способных воздействовать на различные звенья патологического процесса [14, 15, 17].

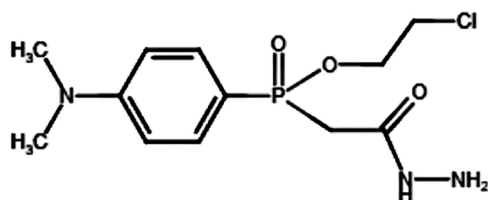


Рис. 1. Структурная формула КАПАХ (2-хлорэтокси-пара-N-диметиламинофенил фосфорилацетогидразид)
Fig. 1. Structural formula of CAPAH (2-chloroethoxy-para-N-dimethylaminophenyl phosphorylacetohydrazide)

КАПАХ был синтезирован на кафедре органической химии ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» под руководством ведущего научного сотрудника, кандидата химических наук *Р.И. Тарасовой* и в настоящее время находится на завершающей стадии доклинических исследований.

Формирование стереотаксической модели БА / Formation of a stereotaxic model of AD

Исследования были проведены в НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО «Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ на оборудовании ЦКП «Молекулярные и клеточные технологии». В экспериментах были использованы 24 самки белых крыс линии Wistar массой 200–250 г. возрастом 4 месяца. Крысы содержались в хорошо вентилируемом, освещённом, отапливаемом помещении при 12-часовом световом цикле, не более пяти в одной клетке и имели свободный доступ к еде и воде при необходимости.

До начала проведения экспериментов все испытуемые животные содержались в стандартных условиях, при естественном световом режиме на полнорациональной сбалансированной диете (согласно ГОСТ Р 50258-92) с соблюдением международных требований Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, а также согласно «Правила надлежащей лабораторной практики», утверждённым приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016.

При выборе и проведении поведенческих исследований были использованы методы, описанные в «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [21].

Для формирования БА была использована стереотаксическая модель с введением нейротоксического белка β -амилоида в область гиппокампа животных. Известно, что именно агрегация β -амилоида считается одним из главенствующих аспектов патогенеза БА, а симптоматика, наблюдаемая у животных после его введения, сходна с нарушениями, проявляемыми у человека [10, 18, 19].

Животные были разделены на три группы (по 8 животных в каждой). Крысам первых двух групп с использованием стереотаксиса (BIOCAD, Россия) билатерально в область гиппокампа CA1 вводили по 5 мкл заранее проинкубированного при 37 °C β -амилоида 1–42 (Sigma-Aldrich, USA) с использованием стереотаксического атласа по координатам: ML — 2,0 мм, в AP — 3,6 мм, DV — 1,8 мм [22]. Крысам третьей (контрольной группы) стереотаксически по этим же координатам вводили в том же объёме фосфатно-солевой буфер (PBS, Sigma-Aldrich, USA), являющийся растворителем для β -амилоида. Раствор для введения готовили следующим образом: β -амилоид 1–42 (Sigma-Aldrich, USA) растворяли в PBS до концентрации 2 мкг/мкл с последующей агрегацией в термостате при 37 °C в течение 7 дней.

Начиная с 11-го дня после операции, крысы первой опытной группы (со стереотаксическим введением β -амилоида) получали ежедневные внутрибрюшинные инъекции КАПАХ в дозе 10 мг/кг в течение 10 дней. Животные второй опытной группы (со стереотаксическим введением β -амилоида) и крысы контрольной группы (со стереотаксическим введением фосфатного буфера) получали ежедневные внутрибрюшинные инъекции физиологического раствора в том же объёме. После 10 дней введения КАПАХ и физиологического раствора проводили поведенческие тесты «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Водный лабиринт Морриса». Введение КАПАХ и физиологического раствора продолжали и в дни тестов (рис. 2).

Методы поведенческого тестирования / Behavioral testing methods

А) Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) применяли для оценки состояния тревожности [23]. Этот тест позиционируется как один из наиболее чувствительных для исследования тревожности животного [21]. Установка (НПО «Открытая наука», Россия) представляет собой объединение четырёх пластиковых отсеков, два из которых окружены с 3 сторон непрозрачными стенками — «закрытые рукава» (ЗР) (длина рукавов 50 см, высота стенок 30 см, ширина рукавов 14 см). Два оставшихся не имеют стен и являются «открытыми рукавами» (ОР). Закрытые рукава являются аналогом норы, а открытые — потенциально опасной



Рис. 2. Дизайн эксперимента
Fig. 2. Experiment Design

областью. Продолжительность тестирования для каждого животного составляла 5 минут. Крысу помещали в центр лабиринта, носом к открытому рукаву. Критерием, по которому регистрировалось захождение в определённый отсек, считалось наличие всех 4 лап животного внутри помещения [20]. После тестирования каждого животного осуществляли дезодорацию поверхности установки с использованием 3 % перекиси водорода. После каждой группы крыс установку обрабатывали 70 % раствором этанола.

За 5 минут тестирования регистрировали время нахождения в открытых рукавах (ОР) установки как показатель уровня тревожности [23].

Б) Тест «Открытое поле» (НПО «Открытая наука», Россия) предназначен для изучения двигательной исследовательской активности животных [21, 24]. Установка представляет собой камеру круглой формы с непрозрачными стенами (диаметром 97 см, высота стенок 42 см). Пол установки расчерчен на сектора для удобства визуальной регистрации. Кроме того, в полу имеются отверстия, имитирующие норки (диаметром 2 см). Критерием перехода из одного сектора в другой являлось нахождение задних лап в новом секторе. После тестирования каждого животного осуществляли дезодорацию поверхности установки с использованием 3 % перекиси водорода. После каждой группы крыс установку обрабатывали 70 % раствором этанола.

Испытуемое животное помещали в центр установки и за 3 минуты тестирования регистрировали:

1. Число пересечённых линий, что отражает неспецифический уровень возбуждения (двигательная активность);

2. Количество обследованных отверстий, что является показателем исследовательской активности [24, 25].

В) Тест «Водный лабиринт Морриса» использовали для исследования процессов памяти и обучения. Метод основан на том, что животное ищет кратчайший путь в бассейне с водой до спрятанной там «спасительной» платформы на основании предыдущих знаний в процессе обучения о её местонахождении [21, 26].

Лабиринт Морриса представляет собой круглый бассейн (диаметр 1,5 м, глубина — 0,6 м), заполненный водой. В центре одного из секторов бассейна на глубине 1,5–2 см под водой располагается скрытая платформа размером 10 × 10 см, которая в процессе обучения животных должна находиться на одном и том же месте. Воду перед началом эксперимента подкрашивали обезжиренным молочным порошком, чтобы животное не видело сквозь воду установленную платформу. Во время эксперимента поддерживали постоянную температуру воды (+25 °C), так как температурные перепады могут искажать достоверность полученных результатов. Для ориентации животных в бассейне использовали набор так называемых зрительных ориентиров, устанавливае-

мых вокруг бассейна, расположенных по сторонам света — север, юг, запад, восток. На первом этапе животное обучали в течение 3 последовательных дней, по 3 сессии в день. Крыс осторожно опускали в воду мордой к бортику в одной из четырёх стартовых точек на периметре бассейна, выбранных таким образом, чтобы расстояние от них до платформы было приблизительно равным. Животному давали минуту на самостоятельный поиск платформы. Если в течение этого времени крыса не находила платформу, её аккуратно туда направляли. Крысе давали посидеть на платформе в течение 15 с, после чего её перемещали в клетку для просушки. На 4-й день после окончания этапа обучения проверяли показатели памяти. Для того «спасительную» платформу убрали из установки и в течение 1 минуты регистрировали время нахождения животного в зоне, где ранее располагалась платформа. При нормальном состоянии процессов памяти и обучения животное больше времени пребывало в зоне прежнего расположения платформы [26–28].

Регистрация поведенческих изменений животных проводилась с помощью программы для видеотрекинга ANY-maze (Stoelting Co., США). Исследовательская активность животных (количество обследованных отверстий) в тесте «Открытое поле» оценивалась при визуальном анализе видеофайлов с помощью программы RealTimer версии 1.15 (НПО «Открытая наука», Россия).

Полученные результаты обрабатывали статистически при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, где фактором служила принадлежность к экспериментальной группе (контроль, модель без «лечения», модель после «лечения») в программе Graph Pad Prism 8.0.1. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез — $p < 0,05$. Результаты поведенческих тестов представлены в виде $M \pm SEM$, где M — среднее значение, SEM — стандартная ошибка среднего, p — уровень значимости.

Результаты / Results

Результаты изучения поведения животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» представлены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, крысы со стереотаксической моделью БА существенно меньше времени пребывали в «открытых рукавах» (ОР) лабиринта — в 3,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными, что может свидетельствовать о повышенном уровне их тревожности. Многократное введение (11 дней) КАПАХ в режиме «лечения» способствовало развитию анксиолитического эффекта: животные этой группы проводили в 4,6 раза ($p < 0,05$) больше времени в «ОР» по сравнению с «нелечеными» крысами (рис. 3).

Результаты изучения поведения животных в тесте «Открытое поле» представлены на рис. 4 (А, Б).

При проведении тестирования установлено, что для животных с моделью БА было характерно снижение двигательной активности, что выражалось в

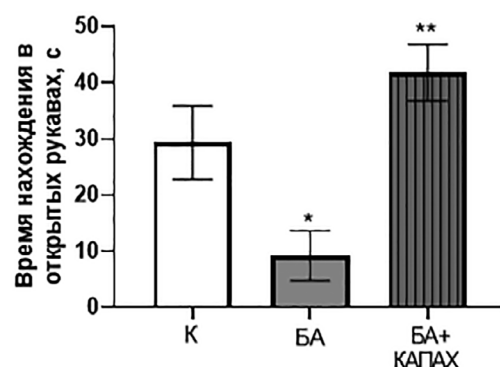


Рис. 3. Влияние КАПАХ на время нахождения в открытых рукавах у крыс со стереотаксической моделью болезни БА в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Fig. 3. Influence of CAPAX on the time spent in the open arms in rats with a stereotaxic model of AD disease in the «Elevated Plus Maze» test

Примечания: по оси абсцисс — время нахождения в «открытых рукавах», с; по оси ординат — группы животных; * ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателю контрольной группы; ** ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателю группы «без лечения» (БА).

Notes: along the abscissa axis — the time spent in the "open arms", s; along the y-axis — groups of animals; * ($p < 0,05$) — statistically significant differences in relation to the indicator of the control group; ** ($p < 0,05$) — statistically significant differences in relation to the indicator of the "no treatment" group (BA).

уменьшении количества пересечённых линий в 1,9 раза ($p < 0,05$) в сравнении с контрольными животными. При этом многократное введение КАПАХ способствовало нормализации данного показателя до уровня здоровых (контрольных) животных (рис. 4А).

При изучении исследовательской активности статистически значимых отличий между группами выявлено не было (рис. 4Б).

Результаты изучения поведения животных в тесте «Водный лабиринт Морриса» представлены на рис. 5.

Как видно из рисунка, крысы со стереотаксической моделью БА без введения КАПАХ тратили в 1,5 ($p < 0,05$) раза больше времени на поиск платформы по сравнению с контрольными животными, что может свидетельствовать о возможных нарушениях когнитивных функций и процессов памяти. При этом время поиска платформы у группы крыс с моделью БА, получавшей КАПАХ, не отличалось от показателей контрольных животных, что может указывать на корригирующее влияние КАПАХ на процессы памяти и обучения.

Обсуждение / Discussion

Согласно имеющимся данным литературы, в концепции терапии БА необходим комплексный подход [4, 6, 9]. Ранее было показано, что КАПАХ и другие соединения ряда фосфорилацетогидразидов обладают мультитаргетным механизмом действия, играющим важную роль в процессах памяти и обучения [14].

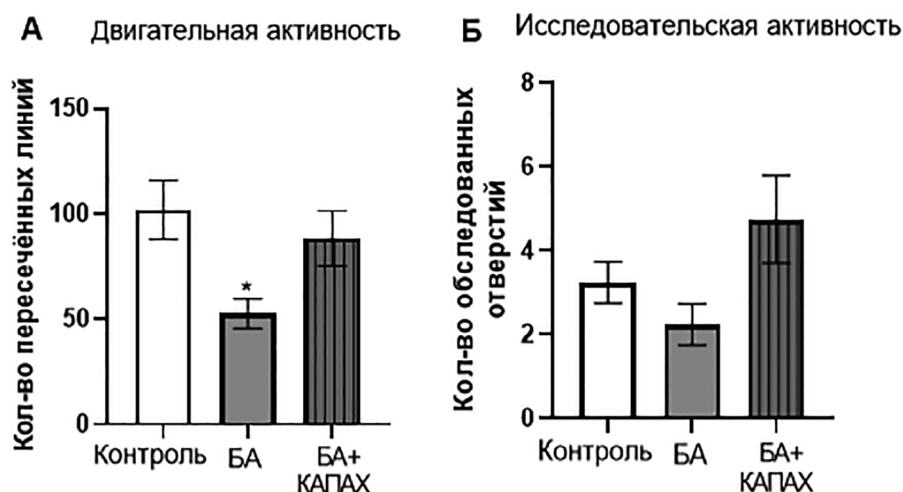


Рис. 4. Влияние КАПАХ на двигательную (А) и исследовательскую (Б) активность крыс с моделью БА в тесте «Открытое поле»

Fig. 4. Effect of CAPAH on motor (A) and exploratory (B) activity of rats with AD model in the «Open field» test

Примечания: по оси абсцисс — показатели активности; по оси ординат — группы животных; * ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателю контрольной группы; ** ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателю группы «без лечения» (БА).

Notes: on the abscissa axis — activity indicators; on the ordinate axis — groups of animals; * ($p < 0.05$) — statistically significant differences in relation to the indicator of the control group; ** ($p < 0.05$) — statistically significant differences in relation to the indicator of the group "without treatment" (BA).

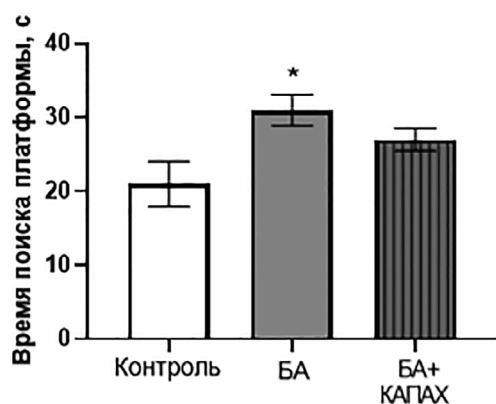


Рис. 5. Влияние КАПАХ на время нахождения в зоне платформы крыс с моделью БА в тесте «Водный лабиринт Морриса»

Fig. 5. Influence of CAPAH on the time spent in the area of the platform in rats with AD model in the «Morris Water Maze» test

Примечания: по оси абсцисс — время поиска платформы, с; по оси ординат — группы животных; * ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателю контрольной группы.

Notes: along the abscissa axis — platform search time, s; along the y-axis — groups of animals; * ($p < 0.05$) — statistically significant differences in relation to the control group.

Так, КАПАХ проявляет свойства частичного агониста глициновых стрихнин-нечувствительных рецепторов NMDA-рецепторного комплекса, взаимодействует с нейрокининовыми NK₁-рецепторами подобно ней-

ропептиду субстанции Р, проявляет антиоксидантные и мембраностабилизирующие свойства. Благодаря этому механизму КАПАХ обладает мнемотропным, антиамнестическим, нейропротекторным, антидепрессивным действием в эксперименте [14, 15, 17].

В данной работе представлены результаты влияния препарата КАПАХ на поведение и когнитивные способности крыс с моделью БА, вызванной путём стереотаксического введения β -амилоида в область гиппокампа. Эта модель получила широкое распространение и считается одним из оптимальных подходов к формированию БА, поскольку она является доступным и достоверным методом воспроизведения *in vivo* амилоидоза и последующих процессов гибели нейронов [20]. Известно, что одним из важнейших признаков БА считается появление амилоидных агрегатов, локализованных в основном во внеклеточном пространстве гиппокампа и коры [10, 18, 20]. Поэтому введение патогенного агента проводится именно в гиппокамп — центр консолидации памяти, а именно, зону CA1 — область, наиболее подверженную нейродегенеративным изменениям, и реже в область неокортекса [10, 20]. Следует отметить, что предпочтение отдаётся длинноцепочечным формам β -амилоида из-за их повышенной нейротоксичности и большей способности к агрегации [10, 13]. При подобных манипуляциях у животных наблюдаются симптомы, схожие с БА у людей: повышенная тревожность, нарушения процессов памяти и обучаемости [10, 18, 20].

Установлено, что препараты, используемые в клинической практике при БА, способны проявлять положительный эффект в данной модели. Так, в ряде исследований было показано, что введение мемантина и антихолинэстеразных средств животным со стереотаксической моделью БА, вызванной путём введения β -амилоида в область гиппокампа, способствует снижению выраженности когнитивных нарушений, симптомов нейродегенерации, а также нормализации поведения [19, 29].

Однако нужно понимать, что при помощи стереотаксического подхода невозможно исследовать этиологию и механизм развития БА, поскольку данная методика направлена на изучение конкретного звена патогенеза — β -амилоидных структур, а также может сопровождаться дополнительными травмами мозга [20].

Основным симптомом БА является нарушение памяти и когнитивных функций. Тест «Водный лабиринт Морриса» позволяет более широко оценивать когнитивные функции в комплексе с пространственной памятью. Эффективность методики подтверждена многочисленными исследованиями в области изучения гиппокамп-зависимой пространственной навигации и «референс-памяти» [27]. Нарушение процессов памяти и когнитивных функций крыс со стереотаксической моделью БА выражалось в увеличении продолжительности поиска спасательной платформы по сравнению с контрольными животными. Многократное введение КАПАХ корригировало эти нарушения — показатели «леченых» крыс не отличались от контрольных значений.

Состояние повышенной тревожности крыс со стереотаксической моделью БА было показано в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»: крысы без «лечения» значительно больше времени проводили в ОР рукавах лабиринта, которые считаются потенциально опасной областью. Применение КАПАХ оказывало анксиолитическое действие, которое выражалось в увеличении длительности пребывания в ОР по сравнению с животными без «лечения». Данные, полученные в тесте «Открытое поле», продемонстрировали снижение двигательной активности у «нелеченых» крыс с БА, которые устранялось при введении КАПАХ.

Анализируя результаты коррекции соединением КАПАХ поведенческих нарушений у крыс с моделью БА, можно сделать вывод, что его эффективность может быть обусловлена способностью одновременно оказывать влияние на патогенетические звенья патологического процесса на данной модели: взаимодействовать с NMDA-рецепторным комплексом через глициновые

стрихнин-нечувствительные участки, оказывать влияние на холинергические структуры через нейрокининовые NK-1 рецепторы, проявлять антиоксидантные и мембраностабилизирующие свойства [14, 15, 17].

Полученные результаты являются основанием для исследования этого соединения на генно-модифицированных моделях БА, созданных путём внесения изменений в экспрессию генов, отвечающих за метаболизм β -амилоида: белка-предшественника β -амилоида APP, и семейства пресенилинов (*PSEN*). Подобные вмешательства влекут за собой увеличение агрегации β -амилоида и образование сенильных бляшек, а у животных проявляются симптомы, сходные с таковыми у пациентов, имеющих БА — снижение когнитивных функций, которые предшествуют образованию бляшек [10, 18, 19].

Выводы / Conclusions

Многократное введение КАПАХ оказывает положительное влияние на процессы обучения и памяти у крыс со стереотаксической моделью болезни Альцгеймера, вызванной путём введения β -амилоида в область гиппокампа, а также уменьшает состояние тревожности, что было продемонстрировано на поведенческих установках «Водный лабиринт Морриса» и «Приподнятый крестообразный лабиринт».

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest in the submitted article.

Участие авторов. Семина И. И. — концепция и дизайн исследования, общий анализ полученных данных, консультация при написании текста; Малиновская Н. А. — подготовка и планирование работы; Никитин Д. О. — проведение экспериментов, обработка полученных результатов, написание текста; Никитина А. В. — участие в проведении экспериментов и обработке полученных результатов; Семёнова А. А. — помощь в планировании экспериментов.

Participation of authors. Semina II — concept and design of the study, general analysis of the data obtained, consultation when writing the text; Malinovskaya NA — preparation and planning of work; Nikitin DO — conducting experiments, processing the results, writing the text; Nikitina AV — participation in experiments and processing of the results; Semyonova AA — assistance in planning experiments.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Сёмина Ирина Ивановнаe-mail: seminai@mail.ruORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3515-0845>

д. м. н., профессор кафедры фармакологии, заведующая центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Российская Федерация

Semina Irina I.e-mail: seminai@mail.ruORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3515-0845>

Dr. Sci (Med.), Professor of the Department of Pharmacology, Head of the Central Research Laboratory FSBEI HE Kazan SMU MOH Russia, Kazan, Russian Federation

Малиновская Наталия Александровнаe-mail: malinovskaya-na@mail.ruORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0033-3804>

д. м. н., зав. кафедрой биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, с. н. с. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск, Российская Федерация

Malinovskaya Nataliya A.e-mail: malinovskaya-na@mail.ruORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0033-3804>

Dr. Sci (Med.), Head of the Department of Biological Chemistry with courses in Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Senior Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry FSBEI HE Prof. V.F. Voino-Yasenetsky KrasSMU MOH Russia, Krasnoyarsk, Russian Federation

Никитин Дмитрий Олегович*Автор, ответственный за переписку*e-mail: richard4777@yandex.ruORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5773-867X>

Ассистент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Российская Федерация

Nikitin Dmitry O.*Corresponding author*e-mail: richard4777@yandex.ruORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5773-867X>

Assistant of the Department of Pharmacology FSBEI HE Kazan SMU MOH Russia, Kazan, Russian Federation

Никитина Анастасия Вадимовнаe-mail: namovol@mail.ruORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6219-6246>

Ассистент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Российская Федерация

Nikitina Anastasiya V.e-mail: namovol@mail.ruORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6219-6246>

Assistant of the Department of Pharmacology FSBEI HE Kazan SMU MOH Russia, Kazan, Russian Federation

Семёнова Алина Асатовнаe-mail: alina_shamsutdin@mail.ruORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2682-8979>

к. б. н., старший преподаватель кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, н. с. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск, Российская Федерация

Semenova Alina A.e-mail: alina_shamsutdin@mail.ruORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2682-8979>

PhD, Cand. Sci. (Biology), senior lecturer of the Department of Biological Chemistry with a courses of medical, pharmaceutical and toxicological chemistry, researcher at the Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, FSBEI HE Prof. V.F. Voino-Yasenetsky KrasSMU MOH Russia, Krasnoyarsk, Russian Federation

Список литературы / References

1. Васенина Е.Е., Левин О.С., Сонин А.Г. Современные тенденции в эпидемиологии деменции и ведении пациентов с когнитивными нарушениями. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. Спецвыпуски. 2017;117(6-2):87–95. [Vasenina EE, Levin OS, Sonin AG. Modern trends in epidemiology of dementia and management of patients with cognitive impairment. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2017;117(6-2):87–95. (In Russ.).] DOI: 10.17116/jnevro20171176287-95.
2. Кичерова О.А., Рейхерт Л.И. Болезнь Альцгеймера. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2018;118(1):77–81. [Kicherova OA, Reikherth LI. Alzheimer's disease. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2018;118(1):77–81. (In Russ.).] DOI: 10.17116/jnevro20181181177-81.
3. Науменко А.А., Громова Д.О., Трофимова Н.В., Преображенская И.А. Диагностика и лечение болезни Альцгеймера. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2016;8(4):91–97. [Naumenko AA, Gromova DO, Trofimova NV, Preobrazhenskaya IS. Alzheimer's disease: diagnosis and treatment. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2016;8(4):91–97. (In Russ.).] DOI: 10.14412/2074-2711-2016-4-91-97.
4. Сmealкина Л.В., Мельников А.И., Наприенко М.В. Болезнь Альцгеймера: анализ современных и перспективных методов диагностики (обзор литературы). *Вестник новых медицинских технологий*. Электронное издание. 2022. № 5. Публикация 1-3. [Smekalkina LV, Melnikov AI, Naprienko MV. Bolezni' Al'cgejmera: analiz sovremennyh i perspektivnyh metodov diagnostiki (obzor literatury) [Alzheimer's disease: analysis of modern and perspective diagnosis methods (literature review)]. *Journal of New Medical Technologies*. e-edition. 2022. (In Russ.).] DOI: 10.24412/2075-4094-2022-5-1-3.
5. Язуина Н.А., Комлева Ю.К., Салмина А.Б., и др. Эпидемиология болезни Альцгеймера в мире. *Неврологический журнал*. 2012;17(5):32–37. [Yauzina NA, Komleva Yu.K., Salmina AB, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease in the world. *Journal of Neurology*. 2012;17(5):32–37. (In Russ.).]
6. Науменко А.А., Преображенская И.С. Патогенез, диагностика и терапия болезни Альцгеймера. *Медицинский совет*. 2015;(5):46–54. [Naumenko AA, Preobrazhenskaya IS. Patogenez, diagnostika i terapiya bolezni Al'cgejmera. *Meditsinskiy sovet*. 2015;(5):46–54. (In Russ.).] DOI: 10.21518/2079-701X-2015-5-46-54.
7. Григоренко А.П., Рогаяв Е.И. Молекулярные основы болезни Альцгеймера. *Молекулярная биология*. 2007;41(2):331–345. [Grigorenko AP, Rogayev EI. Molecular basics of alzheimer's disease. *Molekulyarnaya biologiya*. 2007;41(2):331–345. (In Russ.).]
8. Тювина Н.А., Балабанова В.В. Лечение болезни Альцгеймера. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2015;7(3):80–85. [Tyuvina NA, Balabanova VV. Treatment for Alzheimer's diseases. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2015;7(3):80–85. (In Russ.).] DOI: 10.14412/2074-2711-2015-3-80-85.
9. Котов А.С., Елисеев Ю.В., Семенова Е.И. Болезнь Альцгеймера: от теории к практике. *Медицинский совет*. 2015;(18):41–45. [Kotov AS, Eliseev YuV, Semenova EI. Bolezni' Al'cgejmera: ot teorii k praktike. *Meditsinskiy sovet*. 2015;(18):41–45. (In Russ.).] DOI: 10.21518/2079-701X-2015-18-41-45.
10. Иптышев А.М., Горина Я.В., Лопатина О.Л. и др. Экспериментальные модели болезни Альцгеймера: преимущества и недостатки. *Сибирское медицинское обозрение*. 2016;(4):5–21. [Iptyshev AM, Gorina YaV, Lopatina OL, et al. Experimental models of Alzheimer's disease: advantages and disadvantages. *Siberian Medical Review*. 2016;(4):5–21. (In Russ.).]
11. Regen F, Hellmann-Regen J, Costantini E, Reale M. Neuroinflammation and Alzheimer's Disease: Implications for Microglial Activation. *Curr Alzheimer Res*. 2017;14(11):1140–1148. DOI: 10.2174/156720501466170203141717.
12. Ng A, Tam WW, Zhang MW, et al. IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP in Elderly Patients with Depression or Alzheimer's disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep*. 2018 Aug 13;8(1):12050. DOI: 10.1038/s41598-018-30487-6.
13. Лобзин В.Ю., Колмакова К.А., Емелин А.Ю. Новый взгляд на патогенез болезни Альцгеймера: современные представления о клиренсе амилоида. *Обзор психиатрии и медицинской психологии имени В.М. Бехтерева*. 2018;(2):22–28. [Lobzin VYu, Kolmakova KA, Emelin AYU. A novel view on Alzheimer's disease pathogenesis: modern concept of amyloid clearance. *V.M. Bekhterev review of psychiatry and medical psychology*. 2018;(2):22–28. (In Russ.).] DOI: 10.31363/2313-7053-2018-2-22-28.
14. Семина И.И., Шиловская Е.В., Тарасова Р.И. и др. Механизмы психотропного действия гидразидов фосфорилированных карбоновых кислот. *Химико-фармацевтический журнал*. 2002;36(4):3–6. [Semina II, Shilovskaya EV, Tarasova RI, et al. Mekhanizmy psihotropnogo deystviya gidrazidov fosforilirovannyh karbonovyh kislot. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2002;36(4):3–6. (In Russ.).] DOI: 10.30906/0023-1134-2002-36-4-3-6.
15. Никитина А.В., Семина И.И., Байчурина А.З., и др. Новые производные фосфорсодержащих соединений с аминокислотными и триазолтионными фрагментами — потенциальные лекарственные средства, улучшающие память и когнитивные функции. *Казанский медицинский журнал*. 2023;104(1):72–80. [Nikitina AV, Semina II, Baychurina AZ, et al. New derivatives of phosphorus-containing compounds with amino acid and triazolethione fragments are potential drugs that improve memory and cognitive functions. *Kazan medical journal*. 2023;104(1):72–80. (In Russ.).] DOI: 10.17816/KMJ108603.
16. Семина И.И., Байчурина А.З., Шиловская Е.В. и др. Исследование метаболических нарушений у крыс при воздействии гипобарической гипоксии и разработка подходов коррекции путём одновременного воздействия на разные звенья патогенеза. *Казанский медицинский журнал*. 2021;102(5):654–662. [Semina II, Baychurina AZ, Shilovskaya EV, et al. Study of metabolic disorders in rats under exposure to hypobaric hypoxia and development of correction approaches by simultaneous action on different elements of pathogenesis. *Kazan medical journal*. 2021;102(5):654–662. (In Russ.).] DOI: 10.17816/KMJ2021-654.
17. Семина И.И., Байчурина А.З. Разработка новых потенциальных лекарственных средств с психотропной активностью среди фосфориллацетогидразидов и других производных фосфорилированных карбоновых кислот — приоритетное направление Казанской школы психофармакологов. *Казанский медицинский журнал*. 2016;97(1):148–155. [Semina II, Baychurina AZ. Development of new potential drugs with psychotropic activity among phosphorylaceto-hydrazides and other phosphorylated carboxylic acids derivatives — priority area of Kazan school of psychopharmacologists. *Kazan medical journal*. 2016;97(1):148–155. (In Russ.).] DOI: 10.17750/KMJ2016-148.
18. Шмакова А.А., Андросова Л.В. Моделирование болезни Альцгеймера на животных. *Психиатрия*. 2018;1(77):97–108. [Shmakova A, Androsova L. Modeling Alzheimer's disease in animals. *Psikhiatriya*. 2018;1(77):97–108. (In Russ.).] DOI: 2618-6667-2018-77-97-108.
19. Колобов В.В., Сторожева З.И. Современные фармакологические модели болезни Альцгеймера. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2014;8(3):38–44. [Kolobov VV, Storozheva ZI. Modern pharmacological models of Alzheimer's disease. *Annals of clinical and experimental neurology*. 2014;8(3):38–44. (In Russ.).] DOI: 10.17816/psaic173.
20. Facchinetti R, Bronzuoli MR, Scuderi C. An Animal Model of Alzheimer Disease Based on the Intrahippocampal Injection of Amyloid β -Peptide (1-42). *Methods Mol Biol*. 2018;1727:343–352. DOI: 10.1007/978-1-4939-7571-6_25.
21. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. / под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К; 2012. [Mironov AN, Bunyatyan ND, Vasiliev AN, et al. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part 1 / ed by AN Mironov. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ.).]
22. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates sixth edition by. *Acad. Press*. 2006;170(547612):10–1016.
23. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007;2(2):322–328. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
24. Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, et al. Determination of motor activity and anxiety related behavior in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013;6(3):126–135. DOI: 10.2478/intox-2013-0020.
25. Henry BL, Minassian A, Young JW, et al. Cross-species assessments of motor and exploratory behavior related to bipolar disorder. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 Jul;34(8):1296–1306. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2010.04.002.
26. Ивлиева А.Л., Петрицкая Е.Н., Рогаткин Д.А., Демин В.А. Методические особенности применения водного лабиринта Морриса для оценки когнитивных функций у животных. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016;102(1):3–17. [Ivlieva AL, Petritskaya EN, Rogatkin DA, Demin VA. Methodological Characteristics of the Use of the Morris Water Maze for Assessment of Cognitive Functions in Animals. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2017;47(4):484–493. (In Russ.).] DOI: 10.1007/s11055-017-0425-z.
27. Чернюк Д.П., Большакова А.В., Власова О.Л., Безпрозванный И.Б. Возможности и перспективы поведенческого теста «Водный лабиринт Морриса». *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2021;107(3):267–287. [Chernyuk DP, Bol'shakova AV, Vlasova OL, Bezprozvanny IB. Opportunities and prospects of the behavioral test "morris water maze". *Russian Journal of Physiology*. 2021;107(3):267–287. (In Russ.).] DOI: 10.31857/S0869813921030043.
28. Svensson M, Hallin T, Broms J, et al. Spatial memory impairment in Morris water maze after electroconvulsive seizures. *Acta Neuropsychiatr*. 2017 Feb;29(1):17–26. DOI: 10.1017/neu.2016.22.
29. Capurro V, Busquet P, Lopes JP, et al. Pharmacological characterization of memquin, a multi-target compound for the treatment of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2013;8(2):e56870. DOI: 10.1371/journal.pone.0056870.

Влияние ингибиторов циклооксигеназы и их комбинаций с мексидолом при курсовом применении на поведение половозрелых крыс

Иванова Е. А., Васильчук А. Г., Матюшкин А. И., Воронина Т. А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Изучено влияние ингибиторов циклооксигеназы (ЦОГ) эторикоксиба (1 и 10 мг/кг) и диклофенака натрия (1 и 5 мг/кг) и их комбинации с 2-этил-6-метил-3-оксипиридина суццинатом (мексидолом, 25 мг/кг) при курсовом введении (перорально, ежедневно, 1 раз в день, 15 дней) на поведение крыс в тестах «Открытое поле», «Вращающийся стержень» и «Приподнятый крестообразный лабиринт». Установлено, что только неселективный ингибитор ЦОГ диклофенак натрия в дозе 5 мг/кг значительно снижает ориентировочно-исследовательскую (тест «Открытое поле») и локомоторную (тест «Вращающийся стержень») активность крыс, что обусловлено периферическим побочным действием препарата. Селективный ингибитор ЦОГ-2 эторикоксиб в дозах 1 и 10 мг/кг увеличивает время нахождения животных на центральной площадке в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» и в дозе 10 мг/кг снижает латентный период начала движения в тесте «Открытое поле». Комбинация мексидола с диклофенаком натрия (1 мг/кг) не вызывает снижения ориентировочно-исследовательской активности и моторный дефицит у крыс, что наблюдается при введении диклофенака натрия в дозе 5 мг/кг. Однако при использовании комбинации мексидола с эторикоксибом (1 мг/кг) наблюдается снижение локомоторной активности крыс в тесте «Вращающийся стержень» при отсутствии значимых отклонений ориентировочно-исследовательского поведения и тревожности животных в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт».

Ключевые слова: ингибиторы циклооксигеназы; диклофенак натрия; эторикоксиб; мексидол; тест «Открытое поле»; тест «Вращающийся стержень»; тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»; крысы

Для цитирования:

Иванова Е. А., Васильчук А. Г., Матюшкин А. И., Воронина Т. А. Влияние ингибиторов циклооксигеназы и их комбинаций с мексидолом при курсовом применении на поведение половозрелых крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(1):33–40. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-33-40>

Поступила: 02 января 2023 г. **Принята:** 06 января 2023 г. **Опубликована:** 24 марта 2023 г.

Effect of multiple-dose regimens of cyclooxygenase inhibitors and their combinations with mexidol on behavior in mature rats

Ivanova EA, Vasilchuk AG, Matyushkin AI, Voronina TA

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. Effects of multiple-dose regimens (oral, daily, once a day for 15 days) of cyclooxygenase (COX) inhibitors etoricoxib (1 and 10 mg/kg), diclofenac sodium (1 and 5 mg/kg) and their combinations with 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate (mexidol 25 mg/kg) on rat behavior were studied in the open field test, rotarod test and elevated plus maze test. Exploratory (in open field test) and locomotor (in rotarod test) behavior of rats was significantly weakened only by the non-selective COX inhibitor diclofenac sodium at 5 mg/kg, which is due to the peripheral side effect of the drug. The selective COX-2 inhibitor etoricoxib increased the time in the central area of the elevated plus maze at 1 and 10 mg/kg and reduced the latent period of locomotion in the open field test at 10 mg/kg. A combination of diclofenac sodium (1 mg/kg) with mexidol neither reduced exploratory behavior nor caused motor deficit in contrast to diclofenac sodium at 5 mg/kg. However, a combination of etoricoxib (1 mg/kg) with mexidol inhibited locomotor activity in the rotarod test. Nevertheless, it produced no significant effects on the exploratory behavior or anxiety of animals in the open field test and elevated plus maze test.

Keywords: cyclooxygenase inhibitors; diclofenac sodium; etoricoxib; mexidol; open field test; rotarod test; elevated plus maze test; rats

For citations:

vanova EA, Vasilchuk AG, Matyushkin AI, Voronina TA. Effect of multiple-dose regimens of cyclooxygenase inhibitors and their combinations with mexidol on behavior in mature rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(1):33–40. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-33-40>

Received: January 02, 2023. **Accepted:** January 06, 2023. **Published:** March 24, 2023.

Введение / Introduction

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) являются одной из наиболее востребованных групп лекарственных средств, эффективность при боли и воспалении и безопасность применения которых определяется их механизмом действия — ингибированием циклооксигеназы (ЦОГ) 1 и 2 типа [1]. Данные большого количества метаанализов клинических и эпидемиологических исследований использования НПВП в клинической практике явились основанием для разработки клинических рекомендаций их назначения с учётом риска нежелательных явлений (НЯ) со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ),

сердечно-сосудистой системы, НПВП-нефропатии и их профилактики [2]. Эти, наблюдаемые прежде всего при длительном применении, НЯ обусловлены периферическим действием НПВП и развиваются вследствие угнетения образования простагландинов при ингибировании ЦОГ. Вместе с тем, ЦОГ-1 и ЦОГ-2 экспрессируются в головном мозге [3, 4], и в клинических исследованиях выявлена способность селективного ингибитора ЦОГ-2 целекоксиба повышать эффективность ингибиторов обратного захвата серотонина: флуоксетина [5], сертралина [6], флувоксамина [7]. Однако результаты других клинических исследований свидетельствуют о повышении риска возникновения депрессий при применении

пациентами ингибиторов ЦОГ, за исключением ацетилсалициловой кислоты [8, 9]. Ввиду того, что периферические НЯ при длительном применении НПВП могут представлять угрозу здоровью и жизни пациентов, пристальное внимание уделяется оценке рисков возникновения и профилактике этих НЯ [10], и небольшое число публикаций освещает побочное действие НПВП, реализующееся за счёт влияния препаратов на ЦНС [11]. В рамках исследования действия НПВП на ЦНС ранее нами было изучено влияние селективного ингибитора ЦОГ-2 эторикоксиба и не-селективного ингибитора ЦОГ диклофенака натрия при однократном пероральном введении на поведение крыс. Установлено, что оба ингибитора ЦОГ в дозе 10 мг/кг снижают двигательную активность крыс, а селективный ингибитор ЦОГ-2, кроме того, вызывает у животных депрессивноподобное поведение [12]. Наряду с этим, показано, что применение диклофенака натрия и эторикоксиба с мексидолом усиливает выраженность противовоспалительного действия этих НПВП [13, 14]. Мексидол обладает нейропротекторным действием, реализующимся за счёт политаргетного механизма, включающего способность препарата улучшать энергетический статус клетки и влиять на процессы в цикле Кребса [15, 16], подавлять перекисное окисление липидов и модифицировать фосфолипидный состав мембран [17–19], повышать активность Se-зависимой глутатионпероксидазы, снижать активность индуцибельной NO-синтазы, связывать супероксидный анион-радикал, уменьшать глутаматную эксайтотоксичность [20]. Кроме того, мексидол увеличивает содержание фосфатидилсерина, фосфатидилинозита и сфингомиелина в синапсомембранных мембранах головного мозга [18, 21], способен индуцировать церебральный митохондриогенез и устранять митохондриальную дисфункцию как у молодых, так и у старых крыс. После курсового введения мексидола в коре головного мозга крыс наблюдается дозозависимая индукция сукцинатного рецептора SUCNR1 и белков-маркеров биогенеза митохондрий: транскрипционного ко-активатора PGC-1 α , транскрипционных факторов (NRF1, TFAM), каталитических субъединиц дыхательных ферментов (NDUFV2, SDHA, *cyt b*, COX2) и АТФ-синтазы (ATP5A) [22]. Митохондриальный биогенез и сукцинатный рецептор рассматриваются в настоящее время как важные патогенетически обоснованные мишени для поиска средств, обладающих нейропротекторным действием [23, 24].

Целью настоящего исследования было изучение влияния диклофенака натрия и эторикоксиба при курсовом ежедневном пероральном введении на ориентировочно-исследовательское поведение, тревожность и локомоторную активность крыс, а также оценка поведения животных при использовании комбинации этих НПВП с сукцинатом 2-этил-6-метил-3-оксипиридина (мексидолом).

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Использовали половозрелых аутбредных белых крыс-самцов массой 240–280 г из питомника лабораторных животных филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА». Организацию и проведение работ осуществляли в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях, и правилами, утверждёнными этической Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Каждая группа крыс на начало опыта включала 10–11 особей.

Объекты исследования. Диклофенак натрия (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария) применяли в дозах 1 мг/кг и 5 мг/кг; эторикоксиб (Merck sharp & Dohme B.V., Нидерланды) — в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг; мексидол (ООО «НПК «ФАРМАСОФТ», Россия) — в дозе 25 мг/кг; использовали комбинации диклофенака натрия в дозе 1 мг/кг и мексидола в дозе 25 мг/кг; эторикоксиба в дозе 1 мг/кг и мексидола в дозе 25 мг/кг; растворителем служил физиологический раствор (ОАО НПК «ЭСКОМ», Россия). Основанием для выбора доз НПВП и мексидола при применении в комбинации явились результаты проведённых экспериментов, свидетельствующие о том, что мексидол в дозе 25 мг/кг усиливает противовоспалительный эффект диклофенака натрия и эторикоксиба в дозе 1 мг/кг до уровня, регистрируемого при их введении в дозе 10 мг/кг [14]. Изучаемые НПВП, мексидол, комбинации НПВП с мексидолом и физиологический раствор (контрольной группе) вводили перорально (ежедневно) на протяжении 15 дней. Последнее введение осуществляли за 1 час до последовательной регистрации поведения животных в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Вращающийся стержень».

Тест «Открытое поле». Поведение крыс регистрировали в течение 3 минут в установке «Открытое поле», круглое (НПК «Открытая Наука», Россия), представляющей собой камеру диаметром 90 см с бортиком высотой 38 см. Пол арены расчерчен на 19 секторов, расположенных в 3 ряда (ряд секторов на периферии, сектора средней части арены и центральный сектор), и имеет 13 отверстий по 4 см. Регистрировали латентный период (ЛП) начала движения в секундах, горизонтальную двигательную активность крыс на периферии и в центральной зоне поля (за центральную зону принимали сектора в средней части поля и центральный сектор), вертикальную двигательную

активность (стойки), число обследованных отверстий. Рассчитывали коэффициент ориентировочно-исследовательской реакции (КОИР) — сумму показателей горизонтальной и вертикальной двигательной активности и числа обследованных отверстий [25].

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт».

В течение 5 мин наблюдения в установке «Приподнятый крестообразный лабиринт» для крыс (НПК «Открытая Наука», Россия) регистрировали время, проведённое животными на центральной площадке, в открытых и закрытых рукавах, и число заходов в открытые и закрытые рукава установки [26].

Тест «Вращающийся стержень». Перед тестированием крыс адаптировали к условиям установки «Вращающийся стержень» для крыс (Rota Rod, Ugo Basile, Италия), осуществляя по 3 посадки на барабан установки со скоростью 5 оборотов в минуту. Тестирование моторного навыка осуществляли при режиме вращения барабана со скоростью от 10 до 30 оборотов в минуту (при ускорении 1 оборот за 10 секунд), регистрируя ЛП крыс в секундах.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы Statistica 10.0. Нормальность распределения данных проверяли критерием Шапиро—Уилка с последующей оценкой межгруппового равенства дисперсий критерием Левена. При нормальном распределении в группах и соблюдении межгруппового равенства дисперсий дальнейшую статистическую обработку проводили путём однофакторного дисперсионного анализа с последующим сравнением групп с помощью критерия Ньюмана—Кейлса и *t*-критерия Стьюдента. При отсутствии нормального распределения использовали критерий Краскела—Уоллиса. При обнаружении статистически значимых различий между группами с помощью критерия Краскела—Уоллиса далее проводили парное сравнение выборок критерием Манна—Уитни. Результаты представляли при применении непараметрической статистики как медиана (1; 3 квартиль), параметрической статистики — как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (стандартное отклонение). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты / Results

В тесте «Открытое поле» диклофенак натрия при пероральном введении в дозе 5 мг/кг в течение 15 дней ослаблял ориентировочно-исследовательскую реакцию (ОИР) крыс. K_{OIR} в группе животных, которым его вводили в дозе 5 мг/кг, был значимо в 2,0 раза ниже, чем в контрольной группе. Снижение ОИР крыс, которым вводили диклофенак натрия в дозе 5 мг/кг, происходило за счёт уменьшения двигательной и исследовательской активности. Так, по сравнению с контрольной группой животных диклофенак натрия в дозе 5 мг/кг значимо снижал горизонтальную двига-

тельную активность крыс на периферии установки «Открытое поле» в 2,8 раза, вертикальную активность — в 4,0 раза, число обследованных отверстий — в 12,0 раз. ЛП начала движения животных, которым вводили диклофенак натрия в дозе 5 мг/кг, соответствовал 7,5 секундам, что значимо не отличалось от показателя контрольной группы, равного 4,0 секундам. Диклофенак натрия при пероральном введении в дозе 1 мг/кг в течение 15 суток не оказывал значимого влияния на ОИР крыс. При этом показатели горизонтальной двигательной активности крыс, которым препарат вводили в дозе 1 мг/кг, на периферии установки и вертикальной двигательной активности были значимо выше, чем при его введении в дозе 5 мг/кг, соответственно, в 3,1 и 3,4 раза. Комбинация диклофенака натрия в дозе 1 мг/кг и мексидола в дозе 25 мг/кг значимо не влияла на КОИР. Вместе с тем отмечена тенденция к повышению двигательной активности крыс, которым вводили эту комбинацию препаратов, в центральной части установки «Открытое поле»: число пересечений границ секторов в этой зоне крысами было в 8 раз выше ($p = 0,09$, критерий Манна—Уитни) по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

Мексидол в дозе 25 мг/кг, этирикоксиб в дозах 1 и 10 мг/кг, комбинация этирикоксиба в дозе 1 мг/кг и мексидола в дозе 25 мг/кг при ежедневном пероральном введении в течение 15 суток значимого влияния на КОИР не оказывала (табл. 1). Однако этирикоксиб в дозе 10 мг/кг в 4 раза сокращал ЛП начала движения при помещении крыс в установку, который рассматривают в качестве показателя стрессового поведения животных, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$, табл. 1).

В тесте «Вращающийся стержень» установлено, что диклофенак натрия в дозе 5 мг/кг при введении в течение 15 дней вызывал моторный дефицит у крыс: ЛП падения крыс, которым вводили этот НПВП, с барабана установки «Вращающийся стержень» был в 1,9 раза ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Диклофенак натрия в меньшей дозе 1 мг/кг, мексидол в дозе 25 мг/кг, их комбинация в этих дозах, этирикоксиб в дозах 1 и 10 мг/кг значимого влияния на локомоторную активность в тесте «Вращающийся стержень» не оказывали. Однако зарегистрирована тенденция к снижению ЛП падения крыс, которым вводили этирикоксиб в дозе 10 мг/кг, с барабана установки по сравнению с контрольной группой (в 1,5 раза, $p = 0,067$, критерий Манна—Уитни). Комбинация этирикоксиба в дозе 1 мг/кг и мексидола в дозе 25 мг/кг вызывала у крыс моторный дефицит, о чем свидетельствовало значимое снижение ЛП падения с установки животных в 1,7 раза по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» крысы контрольной группы продемонстрировали предпочтение затемнённых стенками закрытых рукавов установки, в которых они провели 279,5 из 300 секунд наблюдения. Мексидол в дозе 25 мг/кг,

Влияние диклофенака натрия, эторикоксиба и их комбинаций с мексидолом при курсовом пероральном введении крыс в тестах «Открытое поле» и «Вращающийся стержень»

Таблица 1

Effect of multiple-dose oral regimens of etoricoxib, mexidol and their combinations with mexidol on rat behavior in the open field test and rotarod test

Группа, число животных в группе	«Открытое поле»					ЛП падения с установки «Вращающийся стержень», с
	ЛП начала движения, с	Горизонтальная активность, пересечения границ секторов, ед.		Вертикальная активность, ед.	Число обследованных отверстий, ед.	КОИР
		В центральной части	На периферии			
Контроль, $n = 10$	4,0 (2,0; 4,0)	1,0 (0,0; 5,0)	25,5 (5,0; 29,0)	10,0 (5,0; 13,0)	6,0 (3,0; 9,0)	39,56±6,15 (18,45)
Мексидол 25 мг/кг, $n = 10$	3,0 (2,0; 3,0)	0,0 (0,0; 0,0)	18,0 (10,0; 36,0)	5,5 (3,0; 7,0)	4,5 (1,0; 10,0)	37,22±7,64 (22,93)
Диклофенак 1 мг/кг, $n = 10$	4,0 (2,0; 5,0)	3,0 (1,0; 5,0)	28,0 (19,0; 30,0)	8,5 (5,0; 10,0)	2,5 (1,0; 7,0)	41,89±5,69 (17,08)
Диклофенак 5 мг/кг, $n = 8$	7,5 (2,0; 10,5)	2,0 (0,0; 7,0)	9,0 (3,0; 15,0)*#	2,5 (1,5; 6,0)*#	0,5 (0,0; 5,5)*	19,38±6,09 (17,23)*#
Диклофенак 1 мг/кг + Мексидол 25 мг/кг, $n = 10$	1,5 (1,0; 2,0)	8,0 (1,0; 10,0)	16,5 (15,0; 26,0)	6,5 (5,0; 9,0)	3,5 (2,0; 4,0)	37,33±4,53 (13,58)
Эторикоксид 1 мг/кг, $n = 10$	3,5 (1,0; 6,0)	2,0 (1,0; 6,0)	27,0 (14,0; 32,0)	7,0 (4,0; 9,0)	6,5 (3,0; 9,0)	45,67±5,15 (15,45)
Эторикоксид 10 мг/кг, $n = 11$	1,0 (1,0; 3,0)*	3,0 (1,0; 5,0)	15,0 (8,0; 24,0)	7,0 (2,0; 9,0)	2,0 (1,0; 7,0)	33,50±5,66 (17,89)
Эторикоксид 1 мг/кг + Мексидол 25 мг/кг, $n = 10$	1,5 (1,0; 2,0)	0,0 (0,0; 3,0)	17,0 (10,0; 28,0)	6,5 (3,0; 14,0)	6,0 (2,0; 7,0)	35,44±5,65 (16,96)

Примечания: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Манна–Уитни/t-критерий Стьюдента; # — $p < 0,05$ по сравнению с группой «Диклофенак 1 мг/кг», критерий Манна–Уитни/t-критерий Стьюдента.

Notes: * — $p < 0.05$ compared with the control group, Mann–Whitney test/Student's t-test; # — $p < 0.05$ compared with the group «Diclofenac 1 mg/kg», Mann–Whitney test/Student's t-test.

Влияние диклофенака натрия, эторикоксиба и их комбинаций с мексидолом при хроническом пероральном введении крыс в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Таблица 2

Table 2

Effect of multiple-dose oral regimens of etoricoxib, mexidol and their combinations with mexidol on rat behavior in the elevated plus-maze test

Группа, число животных в группе	Время нахождения, с			Кол-во заходов, ед.		Общее число заходов в рукава, ед.
	на центральной площадке	в открытых рукавах	в закрытых рукавах	в открытые рукава	в закрытые рукава	
Контроль, $n = 10$	7,0 (3,0; 32,0)	0,0 (0,0; 17,0)	279,5 (214,0; 294,5)	0,0 (0,0; 1,5)	2,0 (1,0; 3,5)	2,0 (1,0; 5,0)
Мексидол 25 мг/кг, $n = 10$	40,0 (30,0; 53,0)*	9,0 (3,0; 27,0)	243,0 (211,0; 259,0)	1,0 (1,0; 1,0)	4,0 (2,0; 5,0)	5,0 (3,0; 6,0)
Диклофенак 1 мг/кг, $n = 10$	27,0 (21,0; 37,0)	0,0 (0,0; 6,0)	263,0 (134,0; 279,0)	0,0 (0,0; 1,0)	2,0 (2,0; 4,0)	3,0 (2,0; 4,0)
Диклофенак 5 мг/кг, $n = 8$	18,0 (7,0; 54,0)	0,0 (0,0; 123,0)	222,0 (159,0; 293,0)	0,0 (0,0; 3,0)	2,0 (1,0; 3,0)	2,0 (1,0; 7,0)
Диклофенак 1 мг/кг + Мексидол 25 мг/кг, $n = 10$	15,5 (12,5; 96,0)*	10,0 (0,0; 47,5)	255,0 (98,5; 286,0)	0,5 (0,0; 1,5)	2,0 (1,5; 3,0)	2,0 (2,0; 4,0)
Эторикоксид 1 мг/кг, $n = 10$	63,0 (27,0; 70,0)*	0,0 (0,0; 15,0)	230,0 (221,0; 256,0)	0,0 (0,0; 1,0)	4,0 (3,0; 4,0)	4,0 (3,0; 4,0)
Эторикоксид 10 мг/кг, $n = 11$	56,5 (29,0; 80,0)*	0,0 (0,0; 0,0)	232,5 (220,0; 271,0)	0,0 (0,0; 0,0)	2,0 (2,0; 3,0)	2,5 (2,0; 3,0)
Эторикоксид 1 мг/кг + Мексидол 25 мг/кг, $n = 10$	23,0 (17,0; 31,0)	0,0 (0,0; 2,0)	276,0 (248,0; 281,0)	0,0 (0,0; 1,0)	2,0 (2,0; 5,0)	3,0 (2,0; 5,0)

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Манна–Уитни.
Note: * — $p < 0,05$ compared with the control group, Mann–Whitney test.

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Манна–Уитни.

Note: * — $p < 0.05$ compared with the control group, Mann–Whitney test.

диклофенак натрия и эторикоксиб во всех изучаемых дозах, их комбинации с мексидолом не оказывали значимого влияния на время нахождения животных в открытых и закрытых рукавах установки и на количество заходов в них по сравнению с контрольной группой. Вместе с тем в группе крыс, которым вводили эторикоксиб в дозе 1 мг/кг, зарегистрирована тенденция к увеличению числа заходов в закрытые рукава установки по сравнению с контрольной группой ($p = 0,09$, критерий Манна–Уитни). Их число было значимо в 2 раза выше, чем при введении селективного ингибитора ЦОГ-2 в дозе 10 мг/кг. Хотя изучаемые препараты не оказывали значимого влияния на время нахождения крыс в открытых и закрытых рукавах установки, время нахождения животных на центральной площадке значимо увеличивали эторикоксиб в дозах 1 и 10 мг/кг, мексидол и его комбинация с диклофенаком натрия, соответственно, в 9; 8,1; 5,7 и 2,2 раза. Кроме того, в группе крыс, которым вводили диклофенак натрия в дозе 1 мг/кг, отмечена тенденция к его повышению относительно показателя контрольной группы (в 3,9 раза, $p = 0,057$, критерий Манна–Уитни) (табл. 2).

Обсуждение результатов / Discussion of the results

В головном мозге простагландин E2 при связывании с рецепторами простагландинов EP2 и EP4 активирует протеинкиназу A (PKA) [27], которая фосфорилирует GluR1 субъединицу AMPA рецепторов, что приводит к усилению их транспорта на мембраны нейронов и глии [28]. В свою очередь, введение AMPA в вентральную область покрышки вызывает увеличение уровня дофамина и глутамата, сопровождающееся повышением двигательной активности крыс [29]. Поэтому мы предполагали, что снижение двигательной активности крыс при однократном введении ингибиторов ЦОГ диклофенака натрия и эторикоксиба в дозе 10 мг/кг в тесте «Открытое поле» [12] обусловлено уменьшением уровня простагландина E2, и при курсовом введении этот эффект усилится, но этого не произошло.

В проведённом нами исследовании только диклофенак натрия в дозе 5 мг/кг при введении в течение 15 дней в этом тесте снижал ОИР животных и значимо уменьшал локомоторную активность крыс в тесте «Вращающийся стержень», что мы связываем с его периферическим побочным действием, прежде всего, со стороны ЖКТ. Ранее при двухнедельном пероральном введении диклофенака натрия в дозе 5 мг/кг нами были зарегистрированы железодефицитная анемия, симптомы повреждения ЖКТ, снижение массы тела и при дальнейшем введении препарата в течение недели гибель 40 % крыс [30]. В настоящем исследовании наблюдали гибель 2 из 10 животных, которым перорально вводили диклофенак натрия в дозе 5 мг/кг, что подтверждает наше заключение.

В работе *Napora P и соавторов* [11] описан разнонаправленный эффект селективных ингибиторов ЦОГ-1 и ЦОГ-2 при подкожном введении в течение 10 дней на двигательную активность крыс Wistar в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт». Селективный ингибитор ЦОГ-2 целекоксиб в дозе 10 мг/кг её повышал, а селективный ингибитор ЦОГ-1 SC560 в дозе 3 мг/кг — снижал. В проведённом нами исследовании эторикоксиб при введении в течение 15 дней в дозах 1 и 10 мг/кг и диклофенак натрия в дозе 1 мг/кг не оказывали значимого влияния на двигательную активность крыс, хотя эторикоксиб в дозе 10 мг/кг снижал ЛП начала движения животных в тесте «Открытое поле». Однако в тесте «Вращающийся стержень» при его введении в дозе 10 мг/кг зарегистрирована тенденция к снижению ЛП падения с установки. Это согласуется с полученными данными в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»: число заходов в закрытые рукава установки при введении эторикоксиба в дозе 10 мг/кг было в два раза ниже, чем при его введении в дозе 1 мг/кг.

Мексидол при курсовом пероральном введении в дозе 25 мг/кг (в экспериментах на грызунах при оценке фармакологических эффектов препарата его чаще всего вводят в дозе 100 мг/кг и более) значимо не влиял на поведение крыс в тестах «Открытое поле», «Вращающийся стержень» и «Приподнятый крестообразный лабиринт». Ранее не было выявлено влияния мексидола при однократном пероральном введении в этой дозе на поведение крыс [12] и отёк лап крыс и мышей, однако препарат в этой дозе усиливал антиэкссудативный эффект диклофенака натрия и эторикоксиба [14]. Вместе с тем, комбинации диклофенака натрия или эторикоксиба в дозе 1 мг/кг с мексидолом в дозе 25 мг/кг не вызывали отклонений поведения крыс, наблюдаемых при введении этих НПВП в дозе 10 мг/кг — снижения двигательной активности и при введении эторикоксиба ещё и депрессивноподобного поведения [14].

В настоящем исследовании комбинация мексидола (25 мг/кг) и диклофенака натрия (1 мг/кг) при курсовом введении только на уровне тенденции увеличивала время нахождения крыс в центральной части установки «Открытое поле», чего не наблюдалось в других группах животных. В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» значимого увеличения времени нахождения в открытых рукавах установки крыс, которым вводили эту комбинацию препаратов, также не зарегистрировано. Однако выявлено значимое увеличение времени нахождения животных на центральной площадке, которое рассматривают как показатель принятия решения, при введении комбинации диклофенака натрия и мексидола, мексидола или эторикоксиба в дозах 1 и 10 мг/кг. В тесте «Вращающийся стержень» комбинация мексидола (25 мг/кг) с эторикоксибом (1 мг/кг), но не с диклофенаком натрия (1 мг/кг) значимо снижала ЛП падения крыс

с установки, хотя препараты в этих дозах *per se* значимо не влияли на этот показатель. При изучении влияния эторикоксиба, диклофенака натрия и их комбинаций с мексидолом при введении препаратов в течение трёх недель на артериальное давление, гематологические показатели и массу крыс мексидол не усугублял негативное влияние НПВП на исследуемые параметры [30]. В настоящем исследовании в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» не выявлено значимого влияния комбинации селективного ингибитора ЦОГ-2 эторикоксиба (1 мг/кг) с мексидолом (25 мг/кг) на тревожность, двигательную и исследовательскую активность крыс. Значение ЛП падения крыс, которым вводили диклофенак натрия в дозе 1 мг/кг, с установки «Вращающийся стержень» не отличалось от значений контрольной группы животных и группы животных, которым вводили комбинацию неселективного ингибитора ЦОГ диклофенака натрия (1 мг/кг) и мексидола (25 мг/кг). Известно, что селективное ингибирование ЦОГ-1 снижает длительность вызванной диазепамом потери установочного рефлекса у мышей [31].

Выводы / Conclusions

1. Диклофенак натрия при ежедневном пероральном введении (15 дней) в дозе 5 мг/кг, но не в дозе 1 мг/кг вызывает у крыс снижение ориентировочно-исследовательской активности в тесте «Открытое поле» и моторный дефицит в тесте «Вращающийся стержень».

2. Эторикоксиб при ежедневном пероральном введении (15 дней) в дозах 1 и 10 мг/кг не влияет на ориентировочно-исследовательскую и локомоторную активность крыс. При этом эторикоксиб в дозе 10 мг/кг значимо снижает латентный период начала движения в тесте «Открытое поле» и в дозах 1 и 10 мг/кг увеличивает время нахождения животных на центральной площадке в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт».

3. Мексидол при ежедневном пероральном введении (15 дней) в дозе 25 мг/кг не влияет на ориентировочно-исследовательскую и локомоторную активность крыс, но увеличивает время их нахождения на центральной площадке в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт».

4. Комбинация мексидола (25 мг/кг) с диклофенаком натрия (1 мг/кг) при ежедневном пероральном введении (15 дней) не вызывает снижения ориентировочно-исследовательской активности в тесте «Открытое поле» и моторный дефицит в тесте «Вращающийся стержень» у крыс.

5. Комбинация мексидола (25 мг/кг) с эторикоксибом (1 мг/кг) при ежедневном пероральном введении (15 дней) значимо снижает локомоторную активность крыс в тесте «Вращающийся стержень» в отсутствие значимых отклонений ориентировочно-исследовательского поведения и тревожности животных в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт».

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Иванова Елена Анатольевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: iwanowaea@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4961-2051>

SPIN-код: 5005-0337

к. фарм. н., с. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Ivanova Elena A.

Corresponding author

e-mail: iwanowaea@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4961-2051>

SPIN code: 5005-0337

PhD, Cand. Sci. (Pharm), Senior Research Scientist, Laboratory of psychopharmacology, FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Васильчук Анастасия Геннадьевна

e-mail: jimlev@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9079-1322>

SPIN-код: 5646-4635

м. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Vasilchuk Anastasia G.

e-mail: jimlev@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9079-1322>

SPIN code: 5646-4635

Junior Research Scientist, Laboratory of psychopharmacology, FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Матюшкин Александр Иванович

e-mail: matyushkin.alex@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7640-0551>

SPIN-код: 8157-9580

к. б. н., м. н. с. лаборатории психофармакологии
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени
В.В. Закусова», Москва

Matyushkin Alexander I.

e-mail: matyushkin.alex@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7640-0551>

SPIN code: 8157-9580

PhD, Cand. Sci. (Biology), Junior Research Scientist, Laboratory of psychopharmacology, FSBI
“Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Воронина Татьяна Александровна

e-mail: voroninata38@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>

SPIN-код: 5766-3452

д. м. н., профессор, руководитель лаборатории
психофармакологии ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Россия,
Москва

Voronina Tatiana A.

e-mail: voroninata38@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>

SPIN code: 5766-3452

Dr. Sci. (Med.), professor, Head Laboratory of psychopharmacology, FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

- Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol.* 2020 Oct;180:114147. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114147.
- Каратеев А. Е., Насонов Е. Л., Ивашкин В. Т. и др.; Ассоциация ревматологов России, Российское общество по изучению боли, Российская гастроэнтерологическая ассоциация, Российское научное медицинское общество терапевтов, Ассоциация травматологов-ортопедов России, Российская ассоциация паллиативной медицины. Рациональное использование нестероидных противовоспалительных препаратов. Клинические рекомендации. *Научно-практическая ревматология.* 2018;56(Прил. 1):1–29. [Karateev AE, Nasonov EL, Ivashkin VT, et al; Association of Rheumatologists of Russia, Russian Society for the Study of Pain, Russian Gastroenterology Association, Russian Scientific Medical Society of Therapists, Association of Traumatologists and Orthopedists of Russia, Russian Association of Palliative Medicine. Rational use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Clinical guidelines. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice.* 2018;56(Suppl. 1):1–29. (In Russ).]. DOI: 10.14412/1995-4484-2018-1-29.
- Peri KG, Hardy P, Li DY, Varma DR, Chemtob S. Prostaglandin G/H synthase-2 is a major contributor of brain prostaglandins in the newborn. *J Biol Chem.* 1995 Oct 13;270(41):24615–20. DOI: 10.1074/jbc.270.41.24615.
- Kaufmann WE, Andreasson KI, Isakson PC, Worley PF. Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins.* 1997 Sep;54(3):601–624. DOI: 10.1016/S0090-6980(97)00128-7.
- Sayyah M, Boostani H, Pakseresh S, Malayeri A. A preliminary randomized double-blind clinical trial on the efficacy of celecoxib as an adjunct in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res.* 2011 Oct 30;189(3):403–406. DOI: 10.1016/j.psychres.2011.01.019.
- Abbasi SH, Hosseini F, Modabbernia A, Ashrafi M, Akhondzadeh S. Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled study. *J Affect Disord.* 2012 Dec 10;141(2–3):308–314. DOI: 10.1016/j.jad.2012.03.033.
- Shalbafan M, Mohammadinejad P, Shariat SV, Alavi K, Zeinoddini A, Salehi M, Askari N, Akhondzadeh S. Celecoxib as an Adjuvant to Fluvoxamine in Moderate to Severe Obsessive-compulsive Disorder: A Double-blind, Placebo-controlled, Randomized Trial. *Pharmacopsychiatry.* 2015 Jul;48(4–5):136–140. DOI: 10.1055/s-0035-1549929.
- Hu K, Sjölander A, Lu D, Walker AK, Sloan EK, Fall K, Valdimarsdóttir U, Hall P, Smedby KE, Fang F. Aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs and depression, anxiety, and stress-related disorders following a cancer diagnosis: a nationwide register-based cohort study. *BMC Med.* 2020 Sep 9;18(1):238. DOI: 10.1186/s12916-020-01709-4.
- Kessing LV, Rytgaard HC, Gerds TA, Berk M, Ekstrøm CT, Andersen PK. New drug candidates for depression — a nationwide population-based study. *Acta Psychiatr Scand.* 2019 Jan;139(1):68–77. DOI: 10.1111/acps.12957.
- Карева Е.Н., Олейникова О.М., Сереброва С.Ю. и др. Побочные эффекты НПВС и пути их профилактики. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2022;85(3):33–44. [Kareva EN, Oleinikova OM, Serebrova SYu, et al. Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and how to prevent them. *Experimental and clinical pharmacology.* 2022;85(3):33–44. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-3-33-44.
- Napora P, Kobrzycka A, Pierzchała-Koziec K, Wiecek M. Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on animal behaviour and monoaminergic systems of the rat brain. *Behav Brain Res.* 2023 Feb 13;438:114143. DOI: 10.1016/j.bbr.2022.114143.
- Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Васильчук А.Г., Воронина Т.А. Влияние ингибиторов циклооксигеназы эторикоксиба и диклофенака натрия, а также их комбинаций с мексидолом на поведение крыс. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология.* 2021;76(3):148–154. [Ivanova EA, Matyushkin AI, Vasilchuk AG, Voronina TA. Effect of cyclooxygenase inhibitors etoricoxib and diclofenac sodium and their combinations with mexidol on behavior in rats. *Moscow University Biological Sciences Bulletin.* 2021;76(3):123–129. (In Russ).]. DOI: 10.3103/S009639252103007X.
- Иванова Е.А., Васильчук А.Г., Матюшкин А.И., Воронина Т.А. Усиление противовоспалительного и анальгетического эффекта диклофенака натрия при его применении в комбинации с мексидолом в эксперименте на грызунах. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2020;83(7):22–26. [Ivanova EA, Vasilchuk AG, Matyushkin AI, Voronina TA. Enhancement of the anti-inflammatory and analgesic effect of diclofenac sodium in combination with mexidol. *Experimental and clinical pharmacology.* 2020;83(7):22–26. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-7-22-26.
- Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Васильчук А.Г., Воронина Т.А. Способность мексидола усиливать антиэкссудативное действие диклофенака натрия и эторикоксиба на модели каррагенанового отека у крыс и мышей. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология.* 2021;76(2):61–66. [Ivanova EA, Matyushkin AI, Vasilchuk AG, Voronina TA. Ability of mexidol to enhance antieksudative effect of diclofenac sodium and etoricoxib in rats and mice with carrageenan-induced edema. *Moscow University Biological Sciences Bulletin.* 2021;76(2):46–51. (In Russ).]. DOI: 10.3103/S0096392521020024.
- Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2011;(1):3–19. [Lukyanova LD. Current issues of adaptation to hypoxia. signal mechanisms and their role in system regulation. *Pathological physiology and experimental therapy.* 2011;(1):3–19. (In Russ).]

16. Лукьянова Л.Д. Сигнальные механизмы гипоксии. Монография. М.: РАН; 2019. С. 214 [Lukyanova LD. Signaling mechanisms of hypoxia. Monograph. Moscow: RAS; 2019. (In Russ).]
17. Воронина Т.А. Мексидол: Основные нейropsychотропные эффекты и механизм действия. *Фарматека*. 2009;(6):28–31. [Voronina TA. Meksidol: Osnovnye neipsihotropnye efekty i mekhanizm dejstviya. *Farmateka*. 2009;(6):28–31. (In Russ).]
18. Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д. Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС. — М.: Издательство Института биомедицинской химии; 1995. [Dumaev KM, Voronina TA, Smirnov LD. Antioxidants in the prevention and treatment of CNS pathologies. Moscow: Publishing house of the Institute of Biomedical Chemistry. 1995. (In Russ).]
19. Бурлакова Е.Б., Кайране Ч.Б., Молочкина Е.М., и др. Модификация липидов наружной мембраны митохондрий печени мышей и кинетических параметров мембраносвязанной моноаминоксидазы *in vivo* и *in vitro*. *Вопросы медицинской химии*. 1984;30(1):66–72. [Burlakova EB, Kairane ChB, Molochkina EM, et al. Membrane-modulating effects of 3-hydroxypyridine derivatives. *Questions of medical chemistry*. 1984;30(1):66–72. (In Russ).]
20. Шулькин А.В. Влияние мексидола на развитие феномена экс-айтотоксичности нейронов *in vitro*. *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова*. 2012. Т. 112. № 2. С. 35–39. [Shchulkin AV. Effect of mexidol on the development of the phenomenon of the neuronal excitotoxicity *in vitro*. *Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakov*. 2012;112(2):35–39. (In Russ).]
21. Еременко А.В. Роль мембранотропных свойств производных 3-оксипиридина в фармакологическом эффекте. Автореферат к дис. канд. биол. наук. Москва; 1986. [Eremenko AV. The role of membranotropic properties of 3-hydroxypyridine derivatives in the pharmacological effect. [dissertation] Moscow; 1986. (In Russ).]
22. Кирова Ю.И., Шакова Ф.М., Германова Э.Л., Романова Г.А., Воронина Т.А. Влияние Мексидола на церебральный митохондриогенез в молодом возрасте и при старении. *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова*. 2020;120(1):55–62. [Kirova YuI, Shakova FM, Germanova EL, Romanova GA, Voronina TA. The effect of mexidol on cerebral mitochondriogenesis at a young age and during aging. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry = Zhurnal Nevrologii i Psikhiatrii im. S.S. Korsakova*. 2020;120(1):55–62. (In Russ).]. DOI: 10.17116/jnevro202012001155.
23. Jodeiri Farshbaf M, Kiani-Esfahani A. Succinate dehydrogenase: Prospect for neurodegenerative diseases. *Mitochondrion*. 2018 Sep;42:77–83. DOI: 10.1016/j.mito.2017.12.002.
24. Uittenbogaard M, Chiaramello A. Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des*. 2014;20(35):5574–5593. DOI: 10.2174/1381612820666140305224906.
25. Калинина Т.С., Шимширт А.А., Кудряшов Н.В., и др. Нейростероидогенез и ориентировочно-исследовательское поведение грызунов. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2014;77(2):3–7. [Kalinina TS, Shimshirt AA, Kudryashov NV, et al. Neurosteroidogenesis and exploratory responses in rodents. *Experimental and clinical pharmacology*. 2014;77(2):3–7. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2014-77-2-3-7.
26. Воронина Т.А., Серединин С.Б., Яркова М.А., и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Издательство ФГБУ НЦЭМСП Минздрава России; 2012. С. 264–275. [Voronina TA, Seredenin SB, Yarkova MA, et al. Guidelines for the preclinical study of the tranquilizing (anxiolytic) action of drugs. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Moscow: Publishing house of the Federal State Budgetary Institution NTsEMSP of the Ministry of Health and Social Development of Russia; 2012. (In Russ).]
27. Wright CL, Burks SR, McCarthy MM. Identification of prostaglandin E2 receptors mediating perinatal masculinization of adult sex behavior and neuroanatomical correlates. *Dev Neurobiol*. 2008 Oct;68(12):1406–1419. DOI: 10.1002/dneu.20665.
28. Lenz KM, Wright CL, Martin RC, McCarthy MM. Prostaglandin E regulates AMPA receptor phosphorylation and promotes membrane insertion in preoptic area neurons and glia during sexual differentiation. *PLoS One*. 2011 Apr 7;6(4):e18500. DOI: 10.1371/journal.pone.0018500.
29. Kretschmer BD, Gojny M, Herrera-Marschitz M. Effect of intracerebral administration of NMDA and AMPA on dopamine and glutamate release in the ventral pallidum and on motor behavior. *J Neurochem*. 2000 May;74(5):2049–2057. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.0742049.x.
30. Васильчук А.Г., Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Алексеева С.В., Качалов К.С., Воронина Т.А. Влияние ингибиторов циклооксигеназы этиорикоксиба и диклофенака натрия, а также их комбинаций с мексидолом на артериальное давление и гематологические показатели у крыс. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2022;77(1):22–28. [Vasilchuk AG, Ivanova EA, Matyushkin AI, Alekseeva SV, Kachalov KS, Voronina TA. Effect of cyclooxygenase inhibitors etoricoxib and diclofenac sodium and their combinations with mexidol on blood pressure and hematological indices in rats. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2022;77(1): 18–24. (In Russ).] DOI: 10.3103/S0096392522010059.
31. Liu X, Lee TL, Wong PT. Cyclooxygenase-1 inhibition shortens the duration of diazepam-induced loss of righting reflex in mice. *Anesth Analg*. 2006 Jan;102(1):135–140. DOI: 10.1213/01.ane.0000189102.09347.2e.

Сравнительная оценка эхокардиографических и морфометрических характеристик левого желудочка сердца крыс

Ионова Е. О., Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Крыжановский С. А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Цель исследования. Сравнительная оценка эхокардиографических и морфометрических размеров левого желудочка сердца крыс. **Материалы и методы.** В исследование было включено 10 беспородных крыс-самцов массой 160–180 г. Размеры левого желудочка сердца оценивали при помощи эхокардиографии и морфометрии. Измерения проводили согласно стандартным протоколам. Для проведения морфометрических измерений сердца останавливали в систолу летальной дозой (1,0 мг/кг) 0,025 % раствора строфантина К, а в диастолу — погружением сердец в охлажденный физиологический раствор (бескальциевая среда). **Результаты.** Показано, что систолический размер левого желудочка сердца, согласно данным эхокардиографии, равняется $1,79 \pm 0,10$ мм, а морфометрии — $1,64 \pm 0,09$ мм ($p = 0,302$); диастолический размер левого желудочка, соответственно, $3,42 \pm 0,16$ мм и $3,66 \pm 0,17$ мм ($p = 0,318$). Выявленные расхождения не превышают 10 % и, по всей видимости, связаны с тем, что неинвазивным эхокардиографическим методом измеряются физиологические размеры левого желудочка сердца, а для морфометрических измерений размеров в систолу сердца останавливали инъекцией строфантина К, что влечёт за собой перегрузку клеток сердца ионами Ca^{2+} и вследствие этого контрактуру кардиомиоцитов; посмертная остановка сердца в диастолу, в бескальциевой среде, сопровождается потерей тонуса сердечной мышцы и, следовательно, дилатация левого желудочка будет, естественно, больше, чем физиологическая. **Заключение.** Неинвазивное эхокардиографическое измерение размеров левого желудочка сердца достаточно в полной мере отражает фактические размеры левого желудочка сердца крысы (расхождение не превышает 10 %), т. е. эхокардиографические измерения валидны.

Ключевые слова: эхокардиография; морфометрия; систолический размер левого желудочка сердца; диастолический размер левого желудочка сердца; валидность

Для цитирования:

Ионова Е. О., Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Крыжановский С. А. Сравнительная оценка эхокардиографических и морфометрических характеристик левого желудочка сердца крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(1):41–44. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-41-44>

Поступила: 21 февраля 2023 г. Принята: 25 февраля 2023 г. Опубликовано: 24 марта 2023 г.

Comparative evaluation of echocardiographic and morphometric characteristics of the rat heart left ventricle

Ionova EO, Miroshkina IA, Sorokina AV, Kryzhanovskii SA

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. Purpose of the study. Comparative evaluation of echocardiographic and morphometric dimensions of the rat heart left ventricle. **Materials and methods.** The study included 10 outbred male rats weighing 160–180 g. The size of the heart left ventricle was assessed using echocardiography and morphometry. The measurements were carried out according to standard protocols. To perform morphometric measurements, hearts were stopped in systole with a lethal dose (1.0 mg/kg) of 0.025 % strophanthin K solution, and in diastole, by immersing the hearts in a chilled physiological solution (calcium-free medium). **Results.** It was shown that the systolic size of the left ventricle of the heart according to echocardiography is 1.79 ± 0.10 mm, and morphometry 1.64 ± 0.09 mm ($p = 0,302$); diastolic size of the left ventricle, respectively, 3.42 ± 0.16 mm and 3.66 ± 0.17 mm ($p = 0,318$). The detected discrepancies do not exceed 10 % and, apparently, are due to the fact that the physiological dimensions of the heart left ventricle are measured by a non-invasive echocardiographic method, and for morphometric measurements of the dimensions in the systole, the heart was stopped by injection of strophanthin K, which entails an overload of heart cells with Ca^{2+} ions and as a result, contracture of cardiomyocytes; post-mortem cardiac arrest in diastole, in a calcium-free environment, is accompanied by a loss of cardiac muscle tone and, therefore, dilatation of the left ventricle will naturally be greater than physiological. **Conclusion.** Non-invasive echocardiographic measurement of the size of the heart left ventricle fully reflects the actual size of the left ventricle of the rat heart (the difference does not exceed 10 %), i. e. echocardiographic measurements are valid.

Keywords: echocardiography; morphometry; systolic size of the left ventricle of the heart; diastolic size of the left ventricle of the heart; validity

For citations:

Ionova EO, Miroshkina IA, Sorokina AV, Kryzhanovskii SA. Comparative evaluation of echocardiographic and morphometric characteristics of the rat heart left ventricle. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(1):41–44. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-41-44>

Received: February 21, 2023. Accepted: February 25, 2023. Published: March 24, 2023.

Введение / Introduction

В настоящее время эхокардиография на мелких животных достаточно широко используется для изучения особенностей ремоделирования сердца при различных патологических процессах [1–3] и/или возможности коррекции выявленных нарушений при помощи фармакологических агентов [4–6]. Анализ литературы свидетельствует о том, что в большинстве публикаций фракция выброса (ФВ), характеризующая инотропную функцию левого желудочка сердца,

колеблется в среднем в пределах 75–80–90 % [7–9]. Согласно результатам собственных экспериментов, у беспородных крыс ФВ варьирует в этих же пределах [10, 11]. Иная картина наблюдается в отношении эхокардиографических показателей, отражающих размеры левого желудочка сердца — конечно-систолического (КСР) и конечно-диастолического (КДР) размеров. Так, например, КДР колеблется в среднем в пределах от 2,5 мм до 7,0 мм [9, 12]. Не исключено, что эти различия связаны или с возрастом животных [12], и/или наркозом, под которым производится

эхокардиографическое исследование [13]. В наших исследованиях среднее значение КДР составляет $\approx 3,5$ мм [10, 11]. Вместе с тем, поскольку эхокардиографические исследования используются для оценки степени ремоделирования левого желудочка сердца, представляется несомненно важным понимать, насколько неинвазивный метод измерения позволяет получить объективную информацию о фактических размерах левого желудочка.

Цель настоящего исследования — сравнительная оценка эхокардиографических и морфометрических размеров левого желудочка сердца крыс.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 160–180 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Условия содержания животных соответствовали ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» (Переиздание) и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Переиздание). Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, установленными международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), на основе стандартных операционных процедур, принятых в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Экспериментальный протокол. В исследование было включено 10 животных. На первом этапе всем животным, находящимся под «рауш»-наркозом (кетамин 100 мг/кг, в/б) проводили стандартное эхокардиографическое исследование. На следующий день крыс рандомизировали на две группы по 5 особей в каждой. Животным 1-й группы, для остановки сердца в систолу, в/в вводили летальную дозу строфантина К (1,0 мг/кг), а животных 2-й группы декапитировали, сердца извлекали и для их остановки в диастолу помещали в охлажденный физиологический раствор (бескальциевая среда).

Эхокардиографическое исследование. Крыс анестезировали и фиксировали на операционном подогреваемом столике Surgi Suite (Kent Scientific Corporation, США) в положении на спине. Измерения производили в условиях закрытой грудной клетки и спонтанного дыхания в одномерном М- и

двухмерном В-модальных режимах при положении датчика эхокардиографа в парастеральной позиции по длинной оси сердца. В М-модальном режиме оценивали КСР и КДР размеры левого желудочка сердца. Затем по методу Teichholz рассчитывали показатель сократительной функции сердца — ФВ. Оценку эхокардиографических показателей проводили, как минимум, по пяти последовательным сердечным циклам. Все измерения выполняли в соответствии с Рекомендациями Американского общества и Европейской ассоциации по эхокардиографии [14]. В работе использовали цифровой ультразвуковой эхокардиограф Mindray DC-60 (Китай) с электронным фазированным датчиком P10-4E (5,0/11,0 МГц).

Морфометрическое исследование. Извлечённые из грудной клетки сердца фиксировали в 10 % забуференном растворе формалина (готовый раствор производства ООО «Биовитрум»). Сердца после окончания фиксации и стандартной проводки (автоматизированный тканевой процессор Leica TP1020, Германия) заливали в парафиновые блоки (система заливки тканей с графическим дисплеем Tissue-Tek®TEK™, США). Готовили гистологические срезы сердец (толщиной 5 мкм) с помощью микротомы ротационного Accu-Cut®SPM™, США. Морфометрические измерения производили на поперечном срединном срезе сердца. Препараты фотографировали цифровой зеркальной камерой Canon EOD 1000 с использованием макрообъектива. Фотографии сердец сохраняли в формате jpeg и анализировали с помощью программы Adobe Photoshop CS5.

Статистика. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Так как выборки имели распределение близкое к нормальному, то статистическую значимость различий проверяли с помощью t-критерия Стьюдента для зависимых выборок. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Препараты. Кетамин (субстанция), ЗАО «Акрхин», Россия; Строфантин К (0,025 % раствор), ООО «ОЗ ГНЦЛС», Украина; физиологический раствор, ООО «Мосфарм» Россия.

Результаты и их обсуждение / Results and discussion

Как следует из полученных данных, у всех животных, включённых в эксперимент, ФВ колеблется в пределах 82,3–87,0 %, т. е. соответствует референтным значениям.

У животных 1-й группы, согласно данным эхокардиографии, средняя величина КСР составляет $1,79 \pm 0,10$ мм, а по данным морфометрии максимальный диаметр полости левого желудочка у крыс, у которых сердце было остановлено инъекцией строфантина К в систолу, равняется $1,64 \pm 0,09$ мм. Различия между

показателями, характеризующими размер ЛЖ, при оценке с помощью эхокардиографии и морфометрии, незначительны и статистически не значимы ($p = 0,302$). Максимальные различия зафиксированы у крысы № 3: КСР — 2,00 мм, морфометрия — 1,83 мм; минимальные у крысы № 1: КСР — 1,62 мм, морфометрия — 1,49 мм. Можно полагать, что выявленные различия обусловлены тем, что при эхокардиографическом исследовании оценивается КСР при физиологическом сокращении сердца, тогда как при остановке сердца в систолу, вызванной летальной дозой строфантина К, сокращение миокарда обусловлено перегрузкой клеток сердца ионами Ca^{2+} с последующей контрактурой кардиомиоцитов.

У животных 2-й группы, согласно данным эхокардиографии, средняя величина КДР равна $3,42 \pm 0,16$ мм, а по данным морфометрии максимальный диаметр полости левого желудочка у крыс, у которых сердце было остановлено в диастолу в охлажденном физиологическом растворе (бескальцевая среда), — $3,66 \pm 0,17$ мм. Максимальные различия зафиксированы

у крысы № 10: КДР — 3,62 мм, а морфометрия — 4,02 мм; минимальные у крысы № 6: КДР — 3,23 мм, а морфометрия — 3,39 мм. Так же как и в случае оценки систолического размера сердца, различия между эхокардиографическим и морфометрическим измерениями диастолического размера статистически не значимы ($p = 0,318$). По всей видимости, зафиксированные различия не связаны с ошибкой измерения, а обусловлены тем, что посмертная дилатация миокарда вследствие потери тонуса сердечной мышцы, естественно, больше, чем физиологическая.

Заключение / Conclusions

Таким образом, можно говорить о том, что проводимое нами неинвазивное эхокардиографическое измерение размеров левого желудочка сердца в достаточной мере отражает фактические размеры левого желудочка сердца крысы (расхождение не превышает 10 %), т. е. наши измерения валидны.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Ионова Екатерина Олеговна

e-mail: mrakusha26@rambler.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0154-722X>

SPIN-код: 5042-1952

м. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Ionova Ekaterina O.

e-mail: mrakusha26@rambler.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0154-722X>

SPIN code: 5042-1952

Junior Research Scientist of Laboratory of Pharmacological Screening FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Мирошкина Ирина Александровна

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>

SPIN-код: 4697-7938

н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Miroshkina Irina A.

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>

SPIN code: 4697-7938

Research scientist of the laboratory of drug toxicology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Сорокина Александра Валериановна

e-mail: alex-mike5475@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

к. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Sorokina Alexandra V.

e-mail: alex-mike5475@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Крыжановский Сергей Александрович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., зав. лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Kryzhanovskii Sergey A.

Corresponding author

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

SPIN code: 6596-4865

Dr. Sci (Med.), Head of laboratory of pharmacological screening FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Guo K, Wu J, Kong Y, et al. Label-free and noninvasive method for assessing the metabolic status in type 2 diabetic rats with myocardium diastolic dysfunction. *Biomed Opt Express*. 2020 Dec 17;12(1):480–493. DOI: 10.1364/BOE.413347.
2. Ling Y, Ma J, Qi X, et al. Novel rat model of multiple mitochondrial dysfunction syndromes (MMDS) complicated with cardiomyopathy. *Animal Model Exp Med*. 2021 Dec 6;4(4):381–390. DOI: 10.1002/ame2.12193.
3. Fan ML, Tong HQ, Sun T, et al. Animal model of coronary microembolization under transthoracic echocardiographic guidance in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Sep 3;568:174–179. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.05.045.
4. He A, Qian L, Yan S, et al. Speckle Tracking Echocardiography Verified the Efficacy of Qianyangyuyin Granules in Alleviating Left Ventricular Remodeling in a Hypertensive Rat Model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021 Aug 24;2021:5862361. DOI: 10.1155/2021/5862361.
5. Chen Q, Zeng Y, Yang X, et al. Resveratrol ameliorates myocardial fibrosis by regulating Sirt1/Smad3 deacetylation pathway in rat model with dilated cardiomyopathy. *BMC Cardiovasc Disord*. 2022 Jan 26;22(1):17. DOI: 10.1186/s12872-021-02401-y.
6. Freiwan M, Kovács MG, Kovács ZZA, et al. Investigation of the Antiremodeling Effects of Losartan, Mirabegron and Their Combination on the Development of Doxorubicin-Induced Chronic Cardiotoxicity in a Rat Model. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 16;23(4):2201. DOI: 10.3390/ijms23042201.
7. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LA, et al. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol* (1985). 2011 Aug;111(2):543–551. DOI: 10.1152/japplphysiol.01154.2010.
8. Di Petta A, Simas R, Ferreira CL, et al. Effects of the association of diabetes and pulmonary emphysema on cardiac structure and function in rats. *Int J Exp Pathol*. 2015 Oct;96(5):350–357. DOI: 10.1111/iep.12146.
9. Ortiz VD, Türck P, Teixeira R, et al. Carvedilol and thyroid hormones co-administration mitigates oxidative stress and improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Eur J Pharmacol*. 2019 Jul 5;854:159–166. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.04.024.
10. Ионова Е.О., Барчукова Е.И., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Крыжановский С.А. Сравнительная оценка эхокардиографических характеристик левого желудочка сердца у самок и самцов крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(1):14–17. [Ionova EO, Barchukova EI, Vititnova MB, Tsorin IB, Kryzhanovskii SA. Comparative evaluation of echocardiographic characteristics of the heart left ventricle in female and male rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(1):14–17. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2021-1-14-17.
11. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Столярук В.Н., и др. Хроническая сердечная недостаточность: Трансляционная модель. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2019;167(5):655–660. [Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Stolyaruk VN, et al. Chronic Heart Failure: Translational Model. *Bull Exp Biol Med*. 2019;167(5):706–710. (In Russ).]. DOI: 10.1007/s10517-019-04604-y.
12. Hayward R, Lien CY. Echocardiographic evaluation of cardiac structure and function during exercise training in the developing Sprague-Dawley rat. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011 Jul;50(4):454–461.
13. Stein AB, Tiwari S, Thomas P, et al. Effects of anesthesia on echocardiographic assessment of left ventricular structure and function in rats. *Basic Res Cardiol*. 2007 Jan;102(1):28–41. DOI: 10.1007/s00395-006-0627-y.

Влияние дипептидного миметика 4-й петли NGF ГК-1 на рост опухоли и метастазирование эпидермоидной карциномы лёгкого Lewis у самцов мышей линии C57BL/6

Коваленко Л. П., Журиков Р. В., Поварнина П. Ю., Тарасюк А. В.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Аннотация. В статье представлены результаты изучения противоопухолевого и антиметастатического действия дипептидного миметика фактора роста нервов амида N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина ГК-1 в сравнении с гемцитабином. Двукратное введение противоопухолевого препарата гемцитабина в суммарной дозе 100 мг/кг привело к значимому торможению роста опухоли (ТРО) на 7-, 9-, 15- и 21-е сутки развития опухоли, ТРО составило 60–61 %. Курсовое введение ГК-1 в дозе 10 мг/кг со 2-го по 15-й дни развития опухоли на 15-е сутки вызвало достоверное торможение роста опухоли, ТРО — 57,8 %. У гемцитабина индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) был равен 75,8 %. У животных-опухоленосителей, которым вводили ГК-1 в дозе 10 мг/кг или 30 мг/кг ИИМ составил, соответственно, 44,9 и 47,7 %. Таким образом, ГК-1 в использованном диапазоне доз проявил антиметастатическую активность.

Ключевые слова: индекс ингибирования метастазирования; торможение роста опухоли; дипептидный миметик; ГК-1; NGF; гемцитабин

Для цитирования:

Коваленко Л. П., Журиков Р. В., Поварнина П. Ю., Тарасюк А. В. Влияние дипептидного миметика 4-й петли NGF ГК-1 на рост опухоли и метастазирование эпидермоидной карциномы лёгкого Lewis у самцов мышей линии C57BL/6. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(1):45–50. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-45-50>

Поступила: 21 февраля 2023 г. **Принята:** 25 февраля 2023 г. **Опубликована:** 24 марта 2023 г.

Effect of GK-1 NGF Loop 4 Dipeptide Mimetic on tumor growth and metastasis of Lewis lung carcinoma in experiment on male C57BL/6 mice

Kovalenko LP, Zhurikov RV, Povarnina PYu, Tarasiuk AV

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. Article describes results of study of antitumor and antimetastatic action of dipeptide mimetic of the nerve growth factor amide N-monosuccinyl-L-glutamyl-L-lysine (compound GK-1) in comparison with gemcitabine. Two injections of gemcitabine in total dose of 100 mg/kg resulted in significant tumor growth inhibition by 60–61% on 7th, 9th and 15th days of tumor development. Course administration of GK-1 in doses of 10 mg/kg from 2nd to 15th day of tumor development resulted in significant tumor growth inhibition by 57,8 %. Metastasis inhibition index (MII) of gemcitabine was 75,8 %. MII of GK-1 in doses of 10 mg/kg or 30 mg/kg was 44,9 % and 47,7 % accordingly. It was shown that GK-1 in studied range of doses exerts antimetastatic activity.

Keywords: metastasis inhibition index; tumor growth inhibition; dipeptide mimetic; GK-1; NGF; gemcitabine

For citations:

Kovalenko LP, Zhurikov RV, Povarnina PYu, Tarasiuk AV. Effect of GK-1 NGF Loop 4 Dipeptide Mimetic on tumor growth and metastasis of Lewis lung carcinoma in experiment on male C57BL/6 mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(1):45–50. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-45-50>

Received: February 21, 2023. **Accepted:** February 25, 2023. **Published:** March 24, 2023.

Введение / Introduction

Показана негативная роль NGF в патогенезе онкологических заболеваний, таких как рак лёгкого, поджелудочной железы, рак груди, толстого и тонкого кишечника, предстательной железы [1–3]. Два типа рецепторов нейротрофинов, p75NTR и Trks (TrkA, TrkB, TrkC), были обнаружены не только в нейронах, но и в клетках опухолей, включая глиобластому, нейробластому, миелому, опухоли молочной железы, лёгких, опухоли желудочно-кишечного тракта [1, 3, 4]. При заболеваниях раком активация Trks нейротрофинами стимулирует клеточную пролиферацию и метастазирование [3], а также разрастание нервов в микроокружении опухоли, которые, в свою очередь, экспрессируют нейротрансмиттеры, способствующие ангиогенезу, инвазии и метастазированию клеток опухолей [4].

Предполагается, что для лечения онкологических заболеваний перспективна разработка антагонистов нейротрофиновых тирозинкиназных Trk рецепторов в качестве потенциальных лекарственных средств [4]. Идёт поиск наиболее активных антагонистов Trks, проведены исследования как *in vitro*, так и *in vivo* на мышах на предмет их воздействия на раковые клетки. Было показано, что ряд соединений защищают животных от опухолеобразования, предотвращая пролиферацию клеток и индуцируя апоптоз. В дальнейшем рассматривается применение анти-Trk препаратов в сочетании с классическими противоопухолевыми средствами, для усиления их эффективности и подавления резистентности [3].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в отделе химии был создан мономерный дипептидный миметик 4-й петли фактора роста нервов (nerve growth factor, NGF) амид N-моносукцинил-L-

глутамил-L-лизина (ГК-1) (Середенин С. Б., Гудашева Т. А. Патент RU 2410392 С2), который обладает свойствами антагониста TrkA рецепторов. В экспериментах *in vitro* ГК-1 угнетал фосфорилирование TrkA, снижал жизнеспособность нейронов, подвергнутых окислительному стрессу, и препятствовал нейропротекторным эффектам NGF [5, 6].

Целью настоящей работы было изучение противоопухолевой и антиметастатической активности соединения ГК-1 в сравнении с противоопухолевым препаратом гемцитабином.

Материалы и методы / Materials and methods

Дипептид ГК-1 был синтезирован в отделе химии лекарственных средств НИИ фармакологии имени В.В. Закусова как описано [4]; т.пл. 216 °С (с разложением), $[\alpha]_{25D} -37,0^\circ$ (с 0.1; вода). $C_{15}H_{26}N_4O_7$.

Спектр 1H -ЯМР (DMCO- d_6 — CF_3COOD): 1.33 (2 H, м, $C^{\gamma}H_2$ Lys), 1.54 (2 H, м, $C^{\delta}H_2$ Lys), 1.50 и 1.72 (2 H, два м, $C^{\beta}H_2$ Lys), 1.74 и 1.92 (2 H, два м, $C^{\beta}H_2$ Glu), 2.29 (2 H, т, $C^{\gamma}H_2$ Glu), 2.44 (4 H, м, $HOOCCH_2CH_2CO-$), 2.78 (2 H, м, $C^{\epsilon}H_2$ Lys), 4.18 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Lys), 4.23 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Glu), 7.08 и 7.30 (2 H, 2 с, NH_2 амид), 7.72 (3 H, м, NH_3^+ Lys), 7.88 (1 H, д, NH Lys), 8.17 (1 H, д, NH Glu). $HOOC(CH_2)_2CO-$ и $-COOH$ Glu обмениваются с HDO.

Исследование противоопухолевой и антиметастатической активности ГК-1 было проведено на экспериментальной модели эпидермоидной карциномы лёгкого Lewis (LLC), полученной из банка клеточных культур НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей Научного медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина. Взвесь опухолевых клеток LLC (50 мг в 0,5 мл раствора Хэнкса на мышь) перевивали 40 самцам мышей линии C57Bl/6 подкожно в область подмышечной впадины. Максимальная прививочная доза составляла не менее 5×10^6 клеток/мышь. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считался нулевым днём развития опухоли. В настоящей работе в качестве позитивного контроля был выбран гемцитабин (2'-дезоксидифторцитидин монохлорид), который вошёл в первую линию противоопухолевой терапии и успешно применяется в клинической практике при лечении многих видов злокачественных новообразований, в частности немелкоклеточного рака лёгких [7]. Лиофилизат гемцитабина растворяли в изотоническом растворе натрия хлорида и вводили внутривенно (в/б) в дозе 50 мг/кг на 2-й день и 9-й день развития опухоли. Суммарная доза в 100 мг/кг гемцитабина является субтерапевтической, её выбрали с целью лимитирования токсического действия. Животным опытных 3-й и 4-й групп вводили ГК-1 со 2-го по 15-й день развития опухоли в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг.

В экспериментальных группах было по 10 животных:

1) группа активного контроля с LLC: животные, не получавшие лекарственную терапию; 10 животным с LLC 14 дней в/б вводили 0,2 мл дистиллированной воды;

2) группа животных, которым вводили в/б гемцитабин двукратно на 2-й и 9-й дни развития опухоли (суммарная доза 100 мг/кг);

3) группа животных с LLC, которым вводили в/б в течение 14 дней ГК-1 в дозе 10 мг/кг;

4) группа животных с LLC, которым вводили в/б в течение 14 дней ГК-1 в дозе 30 мг/кг.

Были изучены следующие параметры: ингибирование роста опухоли по объёму, средняя продолжительность жизни (СПЖ), индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) по сравнению с активным контролем. Противоопухолевый эффект регистрировали на 7-, 9-, 16-е, а также на 21-е сутки развития опухоли (7-е сутки после окончания 2-недельного введения ГК-1). Расчёт объёма опухоли проводили после измерения трех её размеров по формуле: $V = A \times B \times C$ на 7-, 9-, 16-е, а также на 21-е сутки развития LLC. Измерение объёма опухоли проводили инженерным микрометром. Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО \%} = [(V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}}] \times 100 \%,$$

где $V_{\text{контроля}}$ — средний объём опухолей в группе активного контроля, (мм^3);

$V_{\text{опыта}}$ — средний объём опухолей в опытной группе, (мм^3).

Согласно методическим рекомендациям, критерии противоопухолевой активности препарата должны учитываться через 7 дней после окончания его введения и ТРО должно быть не менее 70 % [8].

Метастазы в 4 долях правого и одной доли левого лёгкого мышей выявляли под лупой с 8-кратным увеличением (Magnifer Lamp 8608 E-D XB с кольцевой люминесцентной подсветкой). При оценке интенсивности метастазирования использовали следующие показатели: частоту метастазирования LLC вычисляли в процентах (по отношению числа животных с метастазами к общему числу животных в группе); подсчитывали среднее количество метастазов у одного животного в группе; величину различия метастазирования опухоли между активным контролем и опытными группами оценивали по индексу ингибирования метастазирования. Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) определялся по формуле:

$$\text{ИИМ} = (Ak \times Bk) - (A \times B) / Ak \times Bk \times 100 \%,$$

где Ak, A — частота метастазирования в лёгких у мышей контрольной группы и опытной;

Bk, B — среднее число метастазов в лёгких в контрольной и опытной группах.

Степень метастатического поражения лёгких в зависимости от количества и размера метастазов, согласно методическим рекомендациям [9], оценивали по следующим критериям: к лёгкой степени метаста-

тического поражения относится (ЛСП): 0) отсутствие у ряда животных-опухоленосителей метастазов в лёгких; 1) количество метастазов меньше 10 с диаметров не больше 1 мм; 2) количество метастазов от 10 до 30 с диаметром 1 мм.

К высокой степени метастатического поражения относится (ВСП): 3) количество больше 30 метастазов различных размеров, однако отсутствуют сливные; 4) тяжёлое поражение лёгочной ткани, менее 100 штук, однако отсутствуют сливные метастазы; 5) массивное поражение лёгких, более 100 метастазов, наличие сплошных опухолевых узлов.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения STATISTICA 12. Проверка на нормальность распределения была определена с применением критерия Шапиро—Уилка. Все регистрируемые характеристики животных представлены в таблицах в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$) либо медианы и квартилей Me ($Q1 \div Q3$). Для проверки гипотезы об однородности групп исследования с нормальным распределением в исследуемой популяции проводили тестирование отсутствия различий между группами при помощи t -критерия Стьюдента. В случае распределения, отличающегося от нормального, для сравнения показателей использовались непараметрический критерий Манна—Уитни. Оценку гомогенности дисперсий проводили по тесту Левена. Значимость влияния факторов при гомогенной дисперсии определялась с помощью дисперсионного анализа ANOVA, с последующей обработкой методом множественных сравнений по Тьюки. Анализ выживаемости проводился с использованием метода Каплана—Майера, для оценки достоверности различий между кривыми выживаемости использовался F -критерий Кокса. Результаты считались статистически достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Результаты представлены в табл. 1–4 и рисунке.

Согласно данным, представленным в табл. 1, введение противоопухолевого препарата гемцитабина привело к значимому торможению роста опухоли на всех сроках регистрации. Например, на 21-е сутки после окончания введения препарата ТРО составило 60 %. Курсовое введение ГК-1 не приводило к значимому торможению роста опухоли (ТРО) ни на одном сроке наблюдения, кроме 15 суток после введения ГК-1 в дозе 10 мг/кг, ТРО составило 57,8 %.

В табл. 2 представлены данные оценки антиметастатической активности ГК-1.

У гемцитабина, используемого как препарат сравнения, ИИМ составил 75,8 %. У животных-опухоленосителей, которым вводили ГК-1 в дозе 10 мг/кг, ИИМ составил 44,9 %, а в дозе 30 мг/кг ИИМ составил 47,7 %. Таким образом, ГК-1 в использованном диапазоне доз проявил антиметастатическую активность.

В табл. 3 представлены данные, характеризующие степень поражения лёгких в зависимости от количества и размера метастазов. В активном контроле животных с LLC наблюдали по 50 % животных с лёгкой и тяжёлой степенью метастазирования в лёгких. На фоне использования гемцитабина или ГК-1 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг не менее 90 % животных характеризовались лёгкой степенью поражения лёгких. Таким образом, ГК-1 продемонстрировал сходный с гемцитабином антиметастатический эффект.

Согласно данным, представленным в табл. 4 и на рисунке, курсовое введение ГК-1 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг и гемцитабина в суммарной дозе 100 мг/кг не вызывает значимого увеличения средней продолжительности жизни и медианы выживаемости животных-опухоленосителей опытных групп по сравнению с активным контролем.

Заключение / Conclusion

Увеличение экспрессии, активация мутаций и перегруппировка слияний рецепторных тирозинкиназ (RTK) может привести к опухолеобразованию, различным формам воспаления и нейродегенеративным заболеваниям [10].

В данной работе было начато изучение противоопухолевого и антиметастатического действия дипептидного миметика фактора роста нервов амида *N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина (соединения ГК-1), который обладает свойствами антагониста TrkA рецепторов. При подкожной прививке мышам максимального количества (5 млн) опухолевых клеток LLC, на 7-е сутки после окончания введения ГК-1 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг и гемцитабина в суммарной дозе 100 мг/кг не достигнуто эффективного торможения роста опухоли, которое, согласно методическим рекомендациям [8], должно быть не менее 70 %.

Согласно методическим указаниям [9], при изучении антиметастатических свойств соединения, обладающие антиметастатической активностью, должны эффективно ингибировать процесс спонтанного метастазирования перевиваемых опухолей при подкожной или внутримышечной их перевивке в присутствии первичного опухолевого узла на 35–75 %. Этому условию удовлетворяют данные, демонстрирующие, что ИИМ ГК-1 находится на уровне 45–48 %, которые были получены при использовании практически максимальной дозы опухолевых клеток, равной 5×10^6 клеток/мышь, что позволяет надеяться на приращение эффекта ГК-1 при уменьшении прививочной дозы.

Таким образом, полученные данные подтверждают предположение о перспективах поиска соединений для терапии опухолей среди антагонистов TrkA и указывают на целесообразность дальнейшего изучения противоопухолевых и антиметастатических свойств дипептидного миметика фактора роста нервов амида *N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина соединения ГК-1.

Таблица 1

Влияние ГК-1 при 14-дневном внутрибрюшинном введении на рост LLC у мышей C57BL/6

Table 1

Effects of 14-day intraperitoneal administration of GK-1 on tumor growth in C57BL/6 mice with LLC

Группы <i>n</i> = 10	Изменение объёма опухоли LLC							
	7-е сутки развития		9-е сутки развития		15-е сутки развития		21-е сутки развития	
	V_{LLC} мм ³	ТРО %	V_{LLC} мм ³	ТРО %	V_{LLC} мм ³	ТРО %	V_{LLC} мм ³	ТРО %
Активный контроль, LLC	288,6±43,3	—	565,6±37,8	—	2208,7±478,9	—	3649,5±588,4	—
ГК-1, 10 мг/кг, в/б	189,6 ±34,3	34,4	428,3±65,4	24,4	931,9 ±205,0*	557,8	2535,3±433,1	30,5
ГК-1, 30 мг/кг, в/б	239,7±45,2	17,0	352,8±58,3	37,7	1629,6±296,5	226,2	3423,1±547,5	6,2
Гемцитабин, 50 мг/кг, в/б, двукратно	110,6±14,6*	60,5	268,9±32,2*	52,5	867,3±212,7*	660,8	1457,6±240*	60,0
Примечания: <i>n</i> — число животных в группе; * — $p < 0,05$ по критерию Тьюки. Notes: <i>n</i> — number of animals in groups; * — $p < 0,05$ statistically significant difference in comparison to control group, Tukey's test.								

Таблица 2

Влияние ГК-1 при 14-дневном внутрибрюшинном введении на развитие процессов метастазирования у мышей C57BL/6 с LLC

Table 2

Effect of 14-day intraperitoneal administration of GK-1 on metastasis in experiment on C56BL/6 mice with LLC

Группы <i>n</i> = 10	Параметры метастазирования на 21 сутки развития LLC		
	Число животных с метастазами	Количество метастазов на 1 мышь ($M \pm m$)	ИИМ, %
Активный контроль, LLC	100	32,5±2,9	—
ГК-1, 10 мг/кг, в/б	100	19,6±2,6*	44,9
ГК-1, 30 мг/кг, в/б	100	17,0±1,2*	47,7
Гемцитабин, 50 мг/кг, в/б, двукратно	90	9,0±1,5*	75,8
Примечания: <i>n</i> — число животных в группе; * — $p < 0,05$ по критерию Тьюки. Notes: <i>n</i> — number of animals in groups; * — $p < 0,05$ statistically significant difference in comparison to control group, Tukey's test.			

Таблица 3

Влияние ГК-1 при 14-дневном внутрибрюшинном введении на тяжесть метастатического поражения мышей C57BL/6 с LLC

Table 3

Effect of 14-day intraperitoneal administration of GK-1 on severity of metastatic disease in experiment on C56BL/6 mice

Группа <i>n</i> = 10	Степень поражения лёгких метастазами (%)						
	Число животных с метастазами (в %)	ЛСП			ВСП		
		0	1	2	3	4	5
Контроль, LLC	100	—	-	50	40	10	—
ГК-1, 10 мг/кг*	100	—	20	70	10	—	—
	—	—	<i>p</i> < 0,05		<i>p</i> < 0,05		
ГК-1, 30 мг/кг*	100	—	—	100	—	—	—
	—	—	<i>p</i> < 0,05		<i>p</i> < 0,05		
Гёмцитабин, 50 мг/кг, в/б, двукратно	90	10	40	50	—	—	—
	<i>p</i> < 0,01	—	<i>p</i> < 0,01		<i>p</i> < 0,01		
<i>Примечания:</i> <i>n</i> — число животных в группе; <i>p</i> < 0,01 по сравнению с контрольной группой по тесту Манна–Уитни; ЛСП — лёгкая степень метастатического поражения; ВСП — высокая степень метастатического поражения. <i>Notes:</i> <i>n</i> — number of animals in groups; * — <i>p</i> < 0.05 statistically significant difference in comparison to control group, Mann–Whitney test; ЛСП — LCP — low colonization potential; ВСП — HCP — high colonization potential.							

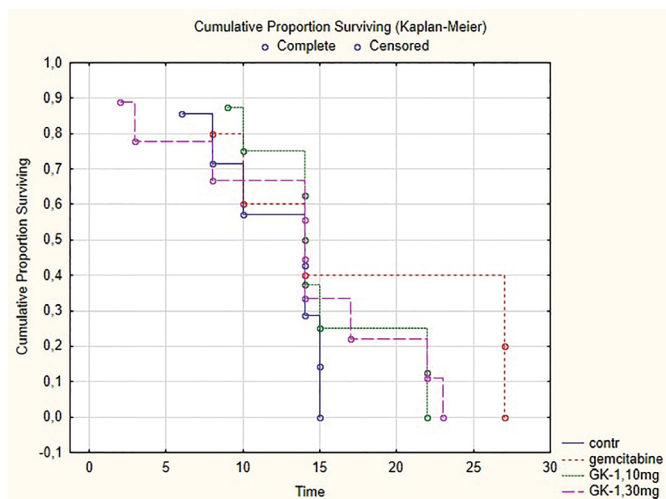


Рис. Влияние ГК-1 при 14-дневном внутрибрюшинном введении на продолжительность жизни мышей C57BL/6 с LLC

Fig. Effect of 14-day intraperitoneal administration of GK-1 on survival rate of C57BL/6 mice with LLC

Таблица 4

Оценка средней продолжительности жизни после курсового введения ГК-1 и гемцитабина мышам C57BL/6 с LLC

Table 4

Median lifespan of C57BL/6 mice with LLC after 14-day intraperitoneal administration of GK-1 and gemcitabine

Группы <i>n</i> = 10	СПЖ, дни	Медиана выживаемости
Контроль LLC	11,7±3,7	14
LLC + ГК-1 10 мг/кг	15,0±4,8	14
LLC + ГК-1 30 мг/кг	13,0±7,4	14
LLC + гемцитабин 50 мг/кг, дважды	17,2±9,2	14

Примечание: *n* — число животных в группе
Notes: *n* — number of animals in groups

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Коваленко Лариса Петровна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: kovalenko.larisa@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/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, Российская Федерация

Kovalenko Larisa P.

Corresponding author

e-mail: kovalenko.larisa@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2083-0832>

SPIN code: 5185-4250

Dr. Sci. (Biology), leading researcher of department of drug toxicology, FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Журиков Руслан Владимирович

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1084-690X>

SPIN-код: 6648-1794

м. н. с. отдела лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Zhurikov Ruslan V.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1084-690X>

SPIN code: 6648-1794

Junior researcher of department of drug toxicology, FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Поварнина Полина Юрьевна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>

SPIN-код: 5498-6724

к. б. н., с. н. с. отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Povarnina Polina Yu.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>

SPIN code: 5498-6724

PhD, Cand. Sci. (Biology), senior researcher of the Department of Chemistry of Medicines, FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Тарасюк Алексей Валерьевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9750-4157>

SPIN-код: 9670-2415

с. н. с. отдела химии лекарственных средств

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени

В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Tarasiuk Aleksey V.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9750-4157>

SPIN code: 9670-2415

Senior researcher of the Department of Chemistry of Medicines, FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Demir IE, Tieftrunk E, Schorn S, Friess H, Ceyhan GO. Nerve growth factor & TrkA as novel therapeutic targets in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Aug;1866(1):37–50. DOI: 10.1016/j.bbcan.2016.05.003.
2. Liu P, Li S, Tang L. Nerve Growth Factor: A Potential Therapeutic Target for Lung Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 24;22(17):9112. DOI: 10.3390/ijms22179112.
3. Meldolesi J. Neurotrophin Trk Receptors: New Targets for Cancer Therapy. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2018;174:67–79. DOI: 10.1007/112_2017_6.
4. Griffin N, Faulkner S, Jobling P, Hondermarck H. Targeting neurotrophin signaling in cancer: The renaissance. *Pharmacol Res*. 2018 Sep;135:12–17. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.07.019.
5. Тарасюк А.В., Шульга Н.В., Сазонова Н.М. и др. Синтез и биологическая активность мономерного дипептидного миметика 4-й петли фактора роста нервов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(7):23–29. [Tarasiuk AV, Shul'ga NV, Sazonova NM, et al. Synthesis and biological activity of the ngf 4th loop monomeric dipeptide mimetic. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2019;53(7):23–29. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-7-23-29.
6. Gudasheva TA, Antipova TA, Seredenin SB. Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor. *Dokl Biochem Biophys*. 2010 Sep-Oct;434:262–265. DOI: 10.1134/S160767291005011X.
7. Гуторов С.Л., Семенов Н.Н., Личиницер М.Р. Роль гемцитабина (гемзара) в терапии неоперабельного немелкоклеточного рака легкого. *Вестник РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН*. 1999;10(2):37–41. [Gutorov SL, Semenov NN, Lichinitser MR. Gemcytabine (Gemsar) in therapy for

inoperable non-small cell lung cancer. *Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS*. 1999;10(2):37–41. (In Russ).].

8. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К; 2012. С. 642–656. [Treschalina EM, Zhukova OS, Gerasimova GK et al. Methodical recommendations for the pre-clinical study of the antitumor activity of drugs. In the book: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. / ed by AN Mironov. Moscow: Grif i K; 2012. P. 642–656. (In Russ).].

9. Зуева Е.П., Козлов А.М., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей. Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина; 2005. С. 674–682. [Zueva EP, Kozlov AM, Gerasimova GK. Metodicheskie ukazaniya po doklonicheskomu izucheniyu sredstv, obladayushih sposobnostyu ingibirovat process metastazirovaniya i povishat effektivnost citostaticheskoy terapii zlokachestvennih opuholey. Rukovodstvo po experimentalnomu doklinicheskomu izucheniyu novih pharmacologicheskikh veschestv / ed by RU Khabriev. M.: Medicina; 2005. P. 674–682. (In Russ).].

10. Narayanan R, Yepuru M, Coss CC, et al. Discovery and preclinical characterization of novel small molecule TRK and ROS1 tyrosine kinase inhibitors for the treatment of cancer and inflammation. *PLoS One*. 2013 Dec 26;8(12):e83380. DOI: 10.1371/journal.pone.0083380.

Изучение острой токсичности ГИЖ-298 на беспородных белых мышах при пероральном введении

Сорокина А. В., Алексеева С. В., Мирошкина И. А., Волкова А. В., Качалов К. С., Захаров А. Д., Алексеев И. В., Дурнев А. Д.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Актуальность. Оценка острой токсичности — обязательный этап доклинического исследования безопасности лекарственных средств и фармацевтических субстанций. Целью настоящего исследования было определение параметров острой токсичности субстанции ГИЖ-298. Методы. ГИЖ-298 вводили однократно перорально аутбредным мышам обоего пола в дозах 350–550 мг/кг. Контрольные мыши получали в тех же условиях 0,5 мл 1 % раствора крахмала. В ходе эксперимента наблюдали за гибелью животных, признаками интоксикации, регистрировали клиническую картину. Патологоанатомическое вскрытие павших мышей проводили по мере их гибели. Выживших мышей вскрывали спустя 14 суток от начала эксперимента, сразу после их эвтаназии. Результаты. Определены среднесмертельные дозы субстанции ГИЖ-298 при пероральном введении мышам: LD₅₀ у самок составила 356 мг/кг, LD₅₀ у самцов — 438 мг/кг. Заключение. Соединение ГИЖ-298 при пероральном введении по классификации Сидорова К.К. (1973 г.) является умеренно токсичным веществом и может быть отнесено к 3 классу токсичности, а в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 — к 3 классу опасности.

Ключевые слова: ГИЖ-298; острая токсичность; мыши; летальные дозы

Для цитирования:

Сорокина А. В., Алексеева С. В., Мирошкина И. А., Волкова А. В., Качалов К. С., Захаров А. Д., Алексеев И. В., Дурнев А. Д. Изучение острой токсичности ГИЖ-298 на беспородных белых мышах при пероральном введении. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(1):51–57. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-51-57>

Поступила: 21 февраля 2023 г. **Принята:** 26 февраля 2023 г. **Опубликована:** 24 марта 2023 г.

Study of acute toxicity of GIZh-298

Sorokina AV, Alekseeva SV, Miroshkina IA, Volkova AV, Kachalov KS, Zakharov AD, Alekseev IV, Durnev AD

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. Relevance. Assay of acute toxicity is a mandatory step in a preclinical safety study of medicines and pharmaceutical substances. The purpose of this study was to determine the parameters of acute toxicity of the substance GIZH-298. Methods. GIZH-298 was administered once orally to outbred mice of both sexes at doses of 350–550 mg/kg. Control mice received 0.5 ml of 1 % starch solution under the same conditions. During the experiment, the death of animals, signs of intoxication were observed, and the clinical picture was recorded. Pathological anatomical autopsy of the dead mice was performed as they died. Surviving mice were autopsied 14 days after the start of the experiment, immediately after their euthanasia. Results. The average lethal doses of the GIZh-298 substance when administered orally to mice were determined: LD₅₀ in females was 356 mg/kg, LD₅₀ in males was 438 mg/kg. Conclusion. Compound GIZH-298 for oral administration according to the classification of Sidorov K.K. (1973) is a moderately toxic substance and can be assigned to the 3rd class of toxicity, and in accordance with GOST 12.1.007-76 — to the 3rd hazard class.

Keywords: GIZh-298; acute toxicity; mice; lethal doses

For citations:

Sorokina AV, Alekseeva SV, Miroshkina IA, Volkova AV, Kachalov KS, Zakharov AD, Alekseev IV, Durnev AD. Study of acute toxicity of GIZh-298. *Farmakokinetika i farmakodinamika* = *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(1):51–57. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-51-57>

Received: February 21, 2023. **Accepted:** February 26, 2023. **Published:** March 24, 2023.

Введение / Introduction

Необходимым этапом доклинического исследования безопасности новых лекарственных средств является определение параметров токсичности.

В ФГБНУ «НИИ Фармакологии имени В.В. Закусова» разработан ряд соединений с противосудорожными свойствами. В частности, соединение под шифром ГИЖ-298 продемонстрировало психотропную и противосудорожную активность в ряде экспериментальных тестов, в том числе и в тесте максимального электрошока, а также высокий терапевтический индекс. Показано, что ГИЖ-298 по противосудорожной активности значительно превосходит вальпроевую кислоту и топирамат [1].

В основе механизма действия соединения ГИЖ-298 лежит его способность увеличивать уровень норадре-

налина в стриатуме мозга крыс, сниженный максимальным электрошоком. С другой стороны, ГИЖ-298 способствует ослаблению функциональной активности дофаминергической системы, увеличенной максимальным электрошоком в данной структуре [2].

В задачу настоящего исследования входило определение среднесмертельной дозы ГИЖ-298 при его пероральном введении мышам, выявление диапазона переносимых и токсических доз, а также оценка сроков и скорости развития интоксикации и гибели мышей с подробным описанием наблюдаемой клинической картины.

Материалы и методы / Materials and Methods

В остром эксперименте была использована субстанция ГИЖ-298 (О-2-морфолиноэтил, оксим 4-бен-

зоилпиридина оксалат), серия 150319. Суспензию готовили *ex tempore* дисперсионным методом на 1 % растворе крахмала.

Исследование было проведено на 48 аутбредных мышах обоего пола (в соотношении 1:1) массой 18–20 г.

Мыши были получены из сертифицированного питомника (филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России) и содержались в виварии в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Работы с мышами выполняли в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными [3] на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», соответствующих правилам Европейской Конвенции ETS 123.

Животные были рандомизированы в опытные и контрольные группы после предварительного 5-дневного карантина и осмотра, исключающего попадание в эксперимент больных и травмированных животных. Группы были сформированы методом случайного отбора с использованием массы тела в качестве ведущего признака (разброс по исходной массе между и внутри групп, в пределах одного пола не превышал $\pm 10\%$).

Объект исследования — суспензию субстанции ГИЖ-298 вводили однократно перорально в дозах 350, 400, 450, 500 и 550 мг/кг. В качестве контрольного объекта использовали 1 % раствор крахмала, который вводили мышам перорально в объёме 0,5 мл [4–6].

За животными опытных и контрольных групп наблюдали в течение 14 суток. Первые 8 часов после введения препарата каждая мышь находилась в индивидуальной пластиковой камере под непрерывным наблюдением. Затем животных помещали в клетки группового содержания. Экспериментальных мышей осматривали ежедневно утром и вечером с целью выявления возможной гибели, а также описания общего состояния и особенностей поведения. Фиксировали: угнетение или активизацию исследовательского поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие неврологического дефицита (нарушение координации движений, тремор и судороги), реакцию на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, эмоциональную напряжённость и груминг, наличие рефлексов (корнеального, ушного и Штрауба), частоту и глубину дыхания, ритм сердечных сокращений, состояние шерстного и кожных покровов, видимых слизистых оболочек [4].

Как рекомендовано в отечественных регулирующих документах [5, 6], в первую неделю наблюдения мышей взвешивали ежедневно, со второй недели и до окончания эксперимента — еженедельно. Массу тела животных определяли с помощью электронных весов SPU 601 (OHAUS Corp., США). Суточное потребление корма и воды фиксировали до введения суспензии ГИЖ-298 или 1 % раствора крахмала, а также в первые, седьмые и четырнадцатые сутки эксперимента.

Животных, павших в ходе исследования, вскрывали. Эвтаназию и патологоанатомическое вскрытие всех выживших к окончанию эксперимента животных проводили на 15-е сутки после введения суспензии ГИЖ-298 или 1 % раствора крахмала.

Статистическая обработка результатов исследования острой токсичности осуществлялась согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [7].

В условиях значительного отклонения выборок от нормального распределения и негомогенности дисперсий были использованы непараметрические методы статистики. Для сравнения зависимых выборок — непараметрический аналог дисперсионного анализа повторных сравнений по Фридману с последующей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену–Кейлсу; для сравнения независимых выборок — непараметрический аналог однофакторного дисперсионного анализа по Краскелу–Уоллису с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну.

В случае использования непараметрических критериев результаты были представлены в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей, в противном случае в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

На основании результатов, полученных при регистрации смертности в течение эксперимента, вычисляли LD_{50} , LD_{16} , $LD_{84} \pm$ стандартная ошибка по методу Литчфилда и Уилкоксона в среде соответствующего программного обеспечения.

Результаты и их обсуждение/Results and discussion

В ходе эксперимента регистрировали гибель всех мышей после перорального введения ГИЖ-298 в дозе 550 мг/кг и части животных после введения соединения в дозах 350, 400, 450 и 500 мг/кг (табл. 1).

Клиническая картина интоксикации при пероральном введении ГИЖ-298 мало отличалась от таковой, наблюдаемой при его внутрибрюшинном

Таблица 1

Показатели смертности беспородных белых мышей после перорального введения соединения ГИЖ-298

Table 1

Mortality rates of mongrel white mice with oral administration of the compound GIZH-298

№	Самки			№	Самцы		
	доза, мг/кг	гибель	в группе		доза, мг/кг	гибель	в группе
1	350	3	6	1	400	2	6
2	450	5	6	2	500	4	6
3	550	6	6	3	550	6	6

введении [8]. Первые минуты после введения соединения мыши были активны, затем через 2–7 мин у животных отмечалось ухудшение состояния, с появлением тонико-клонических судорог, с периодической регистрацией рефлекса Штрауба (рис. 1). В этот же период наблюдения у большинства мышей фиксировали вынужденное положение тела в пространстве с запрокидыванием головы, у некоторых особей была отмечена стереотипия в виде «плавающих» движений. Через 20–30 мин с момента введения ГИЖ-298 у большинства животных наблюдалось снижение двигательной активности, мыши сидели или лежали в боковом положении. Видимые слизистые и кожа были бледными, дыхание — редким и судорожным.

Когда через 8 ч выживших животных перемещали в клетки группового содержания, диапазон двигательной активности варьировал от гиперактивности до полного её отсутствия, независимо от дозы вводимого соединения. У большинства выживших мышей, которые могли двигаться, фиксировали нарушение координации движений и рефлекс Штрауба. Мыши горбились, шерсть была взъерошена, дыхание было редким и глубоким.

Гибель животных наблюдалась в течение первых трёх суток. Первые двое суток у животных отмечалось снижение двигательной активности, у части мышей был выражен тремор и нарушение координации движений. Животные горбились, их шерсть была взъерошена, дыхание было редким и поверхностным. На третьи сутки состояние мышей постепенно улучшалось, а двигательная активность становилась видотипичной. К окончанию эксперимента такие показатели, как дыхание, сердечно-сосудистая деятельность, а также внешний вид шерстного покрова, кожи и видимых слизистых оболочек не отличались от таковых у контрольных мышей.

У контрольных мышей сразу после перорального введения 1 % раствора крахмала в объёме, соответствующем максимально допустимому, не наблюдалось снижения двигательной активности. Через 2–3 мин у большинства мышей наблюдали активный груминг. Состояние шерсти, кожи и видимых слизистых оболочек, а также реакция на внешние раздражители соответствовали норме. Не отмечено нарушений ушного и корнеального рефлексов и рефлекса Штрауба. В течение первых суток наблюдения состояние мышей не изменялось — животные оставались активными, охотно потребляли корм, пили воду. В дальнейшем в течение 14-дневного наблюдения за мышами контрольной группы нарушений рефлексов и других отклонений в состоянии не установлено.

На основании полученных результатов были определены среднесмертельные дозы изученного соединения при его пероральном введении.

У самок аутбредных мышей среднесмертельные дозы соединения ГИЖ-298 при пероральном введении составили:

LD_{16} — 290 (274 – 307) мг/кг;

LD_{50} — 356 (283 – 448) мг/кг;

LD_{84} — 436 (412 – 461) мг/кг.

У самцов аутбредных мышей среднесмертельные дозы соединения ГИЖ-298 при пероральном введении составили:

LD_{16} — 369 (360 – 378) мг/кг;

LD_{50} — 438 (382 – 503) мг/кг;

LD_{84} — 521 (508 – 534) мг/кг.

Установлено, что у аутбредных мышей нет выраженных половых различий в реакциях на пероральное введение ГИЖ-298.



Рис. 1. Самки № 1 и 2 через 5 мин после перорального введения ГИЖ-298 в дозе 450 мг/кг
Fig. 1. Females No. 1 and 2 5 min after oral administration of GIZH-298 at dose of 450 mg/kg

Динамика массы. Установлены значимые различия между показателями динамики массы тела мышей после перорального введения соединения ГИЖ-298 в дозах 350, 400, 450 и 500 мг/кг и контрольными мышами (рис. 2 и 3, табл. 2). Наблюдения за динамикой массы мышей, которым вводили соединение в дозе 550 мг/кг, не осуществляли из-за гибели животных в первые сутки эксперимента.

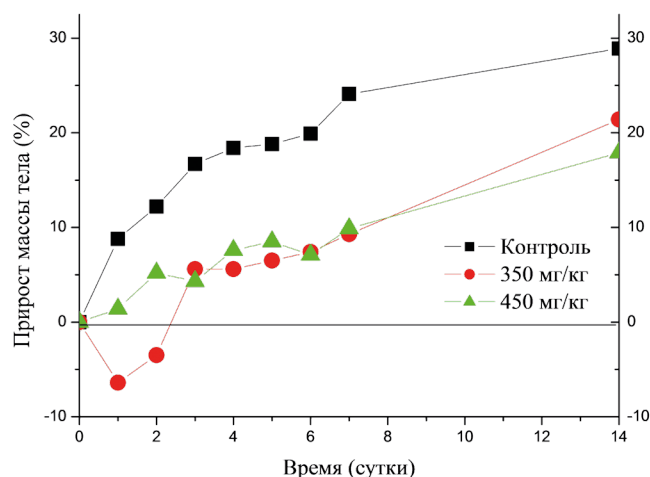


Рис. 2. Динамика прироста массы тела (%) у самок мышей после перорального введения ГИЖ-298 в дозах 350 и 450 мг/кг

Fig. 2. Dynamics of body weight gain (%) in female mice after oral administration of GIZH-298 at doses of 350 and 450 mg/kg

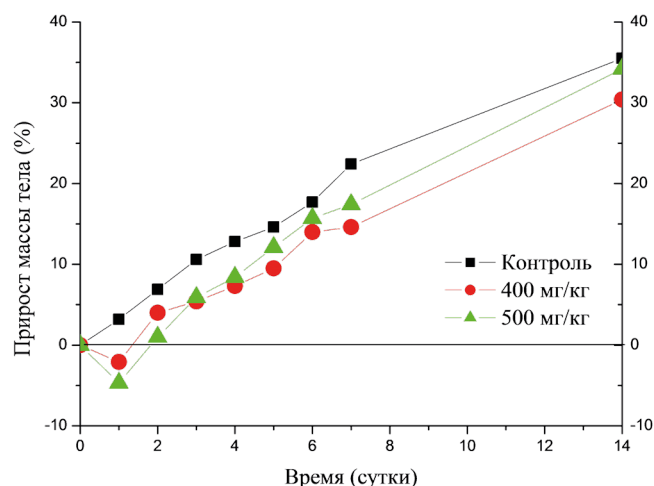


Рис. 3. Динамика прироста массы тела (%) у самцов мышей при пероральном введении соединения ГИЖ-298 в дозах 400 и 500 мг/кг

Fig. 3. Dynamics of body weight gain (%) in male mice after oral administration of the compound GIZH-298 at doses of 400 and 500 mg/kg

В результате в течение всего двухнедельного периода не было установлено дозозависимой реакции на динамику массы мышей экспериментальных групп. Следует отметить, что отрицательная динамика прироста массы отмечалась только в первые сутки. К окончанию первой недели наблюдения значимые различия с контролем имели место у самок во всех экс-

Таблица 2

Динамика массы и её прироста у самцов и самок мышей в течение двух недель после перорального введения соединения ГИЖ-298

Table 2

Dynamics of weight and its gain in male and female mice within two weeks after oral administration of the compound GIZH-298

Группа, пол животных	До введения соединения	1-е сутки масса (г)	Прирост массы (%)	7-е сутки масса (г)	Прирост массы (%)	14-е сутки масса (г)	Прирост массы (%)
Контрольная, 0 мг/кг ♀	20,2 19,0÷20,6	22,3* 21,8÷22,7	8,8 7,4÷15,8	25,0* 24,7÷25,3	24,1 18,8÷31,6	25,6* 25,3÷26,8	28,9 25,7÷33,2
ГИЖ-298 350 мг/кг ♀	20,8 20,4÷21,5	19,3 16,7÷22,5	-6,4 -16,7÷2,0	23,5 20,2÷26,3	9,3 3,1÷16,9	26,1 21,6÷27,6	21,4* 10,2÷22,7
ГИЖ-298 450 мг/кг ♀	21,1 20,3÷21,2	21,5 21,5÷21,5	1,4 1,4÷1,4	23,3 23,3÷23,3	9,9 9,9÷9,9	25,0 25,0÷25,0	17,9 17,9÷17,9
Контрольная, 0 мг/кг ♂	22,1 21,1÷22,5	22,6* 22,2÷23,3	3,2 2,2÷4,0	26,8* 26,1÷27,9	22,4 18,2÷24,1	30,0* 29,7÷30,8	35,5 33,3÷40,8
ГИЖ-298 400 мг/кг ♂	23,2 21,8÷23,8	22,1 20,7÷24,3	-2,1 -10,9÷2,1	27,0 25,8÷29,8	14,6 10,3÷25,5	30,9 28,6÷33,5	30,4 23,0÷40,2
ГИЖ-298 500 мг/кг ♂	22,5 21,8÷24,2	22,78 21,1÷24,4	-4,7 -9,1÷-0,4	28,0 27,1÷28,9	17,4 16,8÷18,0	32,0 31,1÷32,9	34,2 34,1÷34,3

Примечания: * — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных; • — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с исходными данными.

Notes: * — statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the control group of animals; • — statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the initial data.

периментальных группах и у самцов, которым ввели ГИЖ-298 в дозе 400 мг/кг. К окончанию эксперимента значимые различия с контролем сохранялись только у самок экспериментальных групп.

Потребление корма и воды. Наблюдение за потреблением корма и воды позволило установить значимые различия между экспериментальными группами животных после перорального введения соединения ГИЖ-298 в дозах 350, 400, 450, 500 и 550 мг/кг и животными контрольных групп (табл. 3). Следует отметить, что хотя колебания показателей потребления и были статистически значимыми, но они не имели закономерного характера. Показатели потребления корма и воды мышами после введения соединения в дозе 550 мг/кг не представлены в таблице из-за гибели животных в первые двое суток.

Результаты патологоанатомического вскрытия мышей, павших в ходе эксперимента. В ходе изучения острой токсичности ГИЖ-298 при его пероральном введении пали 14 самок, получавших соединение в дозах 350 (3 самки), 450 (5 самок) и 550 (6 самок) мг/кг, и 12 самцов, получавших ГИЖ-298 в дозах 400 (2 самца), 500 (4 самца) и 550 (6 самцов) мг/кг. Гибель части экспериментальных мышей наступала в течение нескольких минут (от 5 до 30 минут) после перорального введения. Часть экспериментальных мышей пало в более поздние сроки после введения ГИЖ-298 (к концу первых, вторых и даже третьих суток). Картина, обнаруженная при проведении патологоанатомического вскрытия всех павших животных, была во многом схожей.

Наружный осмотр трупов павших мышей позволил установить удовлетворительную упитанность и правильное телосложение животных, павших в ранние сроки эксперимента. С увеличением срока гибели экспериментальных мышей менялась и упитанность животных в сторону понижения. А также менялось состояние шерстного покрова — шерсть павших в более поздние сроки мышей была сильно взъерошенной. Кожа была синюшной, повреждений не имела. Видимые слизистые оболочки ротовой и носовой полости, а также конъюнктивы были синюшными. Инъекция видимых сосудов была выраженной.

В ходе патологоанатомического исследования павших мышей было выявлено выраженное расстройство кровообращения. При разрезе кожи трупов павших мышей была обнаружена инъекция сосудов кожи и подкожной клетчатки.

При дальнейшем исследовании была обнаружена выраженная инъекция органов брюшной и тазовой полостей, сосудов брыжейки, тела и рогов матки, лёгочных вен, а также сосудов полушарий головного мозга. Полости желудочков сердца и в большей степени предсердий были переполнены тёмной густой кровью. Почки были бледными. При разрезе почек скальпелем было видно, что мозговое вещество окрашено в тёмно-бордовый цвет. На поверхности яичников самок, надпочечников и тимуса мышей обоих полов были выявлены точечные кровоизлияния.

Результаты патологоанатомического вскрытия мышей, выживших в ходе эксперимента. В ходе эксперимента выжили 21 самка и 21 самец из эксперименталь-

Таблица 3

Оценка суточного потребления воды и корма мышей в течение двух недель после перорального введения соединения ГИЖ-298

Table 3

Estimation of daily water and food intake in mice for two weeks after oral administration of GIZH-298

Группа, пол животных	Корм, г				Вода, мл			
	до введения	1-й день	7-й день	14-й день	до введения	1-й день	7-й день	14-й день
Контрольная, 0 мг/кг ♀	5,5 5,2÷5,7	4,4 [*] 4,3÷4,4	3,7 [*] 3,6÷3,7	4,0 [*] 3,9÷4,1	5,0 4,7÷5,1	3,3 [*] 3,3÷3,4	4,2 [*] 4,1÷4,2	3,3 [*] 3,3÷3,4
ГИЖ-298 350 мг/кг ♀	5,5 5,4÷5,6	3,5 [*] 3,0÷4,0	6,0 [*] 5,2÷6,8	5,2 [*] 4,3÷5,5	6,6 [*] 6,5÷6,8	1,2 [*] 1,1÷1,4	3,4 [*] 2,9÷3,8	6,9 [*] 5,7÷7,3
ГИЖ-298 450 мг/кг ♀	5,7 5,5÷5,7	5,0 5,0÷5,0	8,0 8,0÷8,0	6,0 6,0÷6,0	6,7 [*] 6,4÷6,7	2,0 2,0÷2,0	5,0 5,0÷5,0	5,0 5,0÷5,0
Контрольная, 0 мг/кг ♂	5,9 5,6÷6,0	6,0 [*] 5,9÷6,2	6,6 [*] 6,5÷6,9	7,2 [*] 7,1÷7,4	6,7 [*] 6,4÷6,8	5,0 [*] 4,9÷5,1	8,3 [*] 8,1÷8,6	8,4 [*] 8,3÷8,6
ГИЖ-298, 400 мг/кг ♂	7,4 [*] 7,0÷7,6	3,5 [*] 3,3÷3,9	8,5 [*] 8,1÷9,4	11,2 [*] 10,4÷12,1	3,4 [*] 3,2÷3,5	2,5 [*] 2,3÷2,8	8,5 8,1÷9,4	7,5 6,9÷8,1
ГИЖ-298, 500 мг/кг ♂	7,9 [*] 7,7÷8,5	5,5 5,1÷5,9	11,0 10,6÷11,4	9,0 8,7÷9,3	6,6 6,4÷7,1	1,5 1,4÷1,6	5,0 4,8÷5,2	10,0 9,7÷10,3

Примечания: * — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных; ^{*} — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с исходными данными.

Notes: * — statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the control group of animals; ^{*} — statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the initial data.

ных групп. Морфологическая картина, обнаруженная после эвтаназии и патологоанатомического вскрытия всех выживших к 14-м суткам экспериментальных мышей, а также контрольных мышей (6 самок и 6 самцов), была однотипной.

При наружном осмотре тушек мышей было установлено, что все животные были пропорционального телосложения, удовлетворительной упитанности. Шерсть экспериментальных мышей была гладкой, блестящей. Видимые слизистые оболочки ротовой и носовой полости, а также конъюнктивы были беловато-розовыми. Инъекция сосудов была умеренной.

Морфологическая картина грудной и брюшной полостей, полости черепа, органов кровообращения, дыхания, пищеварения, кроветворения, мочевыводящей, половой и эндокринной систем, опорно-двигательного аппарата, обнаруженная после эвтаназии и патологоанатомического вскрытия всех экспериментальных мышей, не отличалась от таковой, наблюдаемой у контрольных животных.

Заключение/Conclusion

В результате изучения острой токсичности соединения ГИЖ-298 на аутбредных мышах обоего пола при пероральном введении в дозах 350, 400, 450, 500 и 550 мг/кг определены среднесмертельные дозы. В опытах на мышах у самок LD_{50} составила 356 (283 – 448) мг/кг, LD_{16} – 290 (274 – 307) мг/кг, LD_{84} – 436 (412 – 461) мг/кг. У самцов LD_{50} составила 438 (382 – 503) мг/кг, LD_{16} – 369 (360 – 378) мг/кг, LD_{84} – 521 (508 – 534) мг/кг.

Исходя из полученных данных, соединение ГИЖ-298 при пероральном введении по классификации *Сидорова К.К.* (1973 г.) является умеренно токсичным веществом и может быть отнесено к 3 классу токсичности, а в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 – к 3 классу опасности.

Исследование выполнено в рамках темы 122020100334-2 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Сорокина Александра Валериановна
Автор, ответственный за переписку

e-mail: alex54.sorokina@icloud.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

к. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Sorokina Alexandra V.
Corresponding author

e-mail: alex54.sorokina@icloud.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

PhD, Cand. Sci. Biology, Leading researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Алексеева Светлана Витальевна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1262-6997>

SPIN-код: 8985-3418

с. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Alekseeva Svetlana V.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1262-6997>

SPIN code: 8985-3418

Senior Researcher at the Laboratory of Drug Toxicology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Мирошкина Ирина Александровна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>

SPIN-код: 4697-7938

н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Miroshkina Irina A.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>

SPIN code: 4697-7938

Researcher scientist of the laboratory of drug toxicology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Волкова Анна Валерьевна

с. н. с. лаборатории психофармакологии

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени

В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Volkova Anna V.

Senior researcher of the laboratory of psychopharmacology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Качалов Кирилл Сергеевич

SPIN-код: 2992-6789

м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Kachalov Kirill S.

SPIN code: 2992-6789

Junior researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Захаров Алексей Дмитриевич

SPIN-код: 9013-6228

м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Zakharov Aleksey D.

SPIN code: 9013-6228

Junior researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Алексеев Иван Владимирович

SPIN-код: 9757-6210

инженер лаборатории фармакологии мутагенеза ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Alekseev Ivan V.

SPIN code: 9757-6210

engineer of the laboratory of pharmacology of Mutagenesis FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Дурнев Андрей ДмитриевичORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>

SPIN-код: 8426-0380

д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией лекарственной токсикологии, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Durnev Andrey D.ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>

SPIN code: 8426-0380

Dr. Sci (Med.), professor, corresponding member RAS, Head of the department of drug toxicology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Гайдуков И. О., Литвинова С. А., Воронина Т. А., и др. Исследование противосудорожного действия производного оксима 4-бензоилипиридина (ГИЖ-298) и вальпроевой кислоты на модели эпилептического статуса у крыс с кобальт-индуцированным очагом. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. 2017;9(2):57–66. [Gaydukov IO, Litvinova SA, Voronina TA, et al. 4-Benzoylpyridine oxime derivative (GIZH-298) versus valproic acid: the anticonvulsant potential effect in a model of epilepsy in rats with cobalt-induced lesions. *Epilepsy and paroxysmal conditions*. [Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya]. 2017;9(2):57–66. (In Russ).]. DOI: 10.17749/2077-8333.2017.9.2.057-066.
2. Литвинова С.А., Наркевич В.Б., Гайдуков И.О., Кудрин В.С., Воронина Т.А. Изучение влияния производного оксимов пиридина (ГИЖ-298) на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс на фоне судорог, вызванных максимальным электрошоком. *Нейрохимия*. 2019;36(3):239–245. [Litvinova SA, Narkevich VB, Gaidukov IO, Kudrin VS, Voronina TA. Analysis of the effect of derivative of pyridine oximes (GIZH-298) on the content of monoamines and their metabolites in the structures of rat brain structures during seizures caused by maximum electric shock. *Neurochemical Journal*. 2019;36(3):239–245. (In Russ).]. DOI: 10.1134/S1027813319020055
3. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press (US). Washington (DC). 2011. DOI: 10.17226/12910
4. Бельский М.Б. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Медгиз; 1963. [Belen'kii M.B. Elementy kolichestvennoi otsenki farmakologicheskogo effekta. L.: Medgiz; 1963. (In Russ).].

5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. Изучение острой токсичности. М.: Гриф и К; 2012. С. 15–17. [Guidance on Preclinical Evaluation of Medicines. Part 1. Metodicheskie rekomendatsii po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya lekarstvennykh sredstv. Izuchenie ostroi toksichnosti. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ).].
6. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств. РД 64-126-91. М.: МЗ России, ФК; 1992. [Pravila doklinicheskoi otsenki bezopasnosti farmakologicheskikh sredstv. RD 64-126-91. Moscow: Rosminzdrav, FK; 1992. (In Russ).].
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. М.: Медицина; 2005. С. 41–47. [Guideline for Experimental (Preclinical) Studying of New Pharmacological Substances. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya farmakologicheskikh veshchestv. Moscow: Medicine; 2005. (In Russ).].
8. Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Волкова А.В., Забродина В.В., Алексеев И.В., Качалов К.С., Захаров А.Д., Алексеева С.В. Исследование острой токсичности ГИЖ-298. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2020;(4):47–53. [Miroshkina IA, Sorokina AV, Volkova AV, Zaborodina VV, Alekseev IV, Kachalov KS, Zakharov AD, Alekseeva SV. Study of acute toxicity of GIZH-298. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(4):47–53. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-4-47-53.

Валидация тест-системы для количественного определения концентрации трастузумаба (Герцептин, Гертикад) в биологических жидкостях методом твердофазного иммуноферментного анализа

Писарев В. В., Иванов А. В.

Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственный центр Пробиотек»,
Москва, Российская Федерация

Аннотация. Актуальность. Трастузумаб является препаратом выбора для терапии HER2+ рака молочных желез. Для определения фармакодинамики препарата при персонализированной терапии необходима валидированная биоаналитическая методика определения концентрации препарата в биологических жидкостях. Цель работы: создание и оценка пригодности (валидация) тест-системы на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) для количественного определения концентрации трастузумаба в сыворотке/плазме крови человека. Материалы и методы. Представленная тест-система является классическим ИФА набором с 96-луночным полистероловым планшетом, лунки которого покрыты специфическими к трастузумабу моноклональными антителами, вторичными козьими антителами к Fc фрагменту, конъюгированными с пероксидазой хрена, субстратного раствора — (3,5,3',5')-тетрамилбензидина (ТМБ) и стоп-раствора. Растворы для контроля качества готовились путём разведения известных концентраций трастузумаба в бланковой сыворотке. Результаты. В ходе работы установлены предел обнаружения (0,84 нг/мл) и нижний предел количественного определения (1,41 нг/мл) трастузумаба в сыворотке/плазме крови, доказана высокая селективность определения аналита в многокомпонентной матрице. Найденные средние значения концентраций трастузумаба не отклонялись от номинальных значений на более чем 11,42 % во всём диапазоне определяемых концентраций, внутри- и межсерийная прецизионность тест-системы не превышала 11,31 %, общая ошибка метода — 20,0 %. Продемонстрированные характеристики позволяют применять данную тест-систему для анализа широкого диапазона концентраций трастузумаба в биологических образцах. Стабильность компонентов тест-системы определена как не меньше 1 года при соблюдении условий хранения. Заключение. Представленная тест-система соответствует международным валидационным требованиям и пригодна для практического применения.

Ключевые слова: трастузумаб; ИФА; валидация; фармакокинетика

Для цитирования:

Писарев В. В., Иванов А. В. Валидация тест-системы для количественного определения концентрации трастузумаба (Герцептин, Гертикад) в биологических жидкостях методом твердофазного иммуноферментного анализа. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(1):58–64. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-58-64>

Поступила: 21 февраля 2023 г. **Принята:** 24 февраля 2023 г. **Опубликована:** 24 марта 2023 г.

Validation of ELISA Test-system for Trastuzumab (Herceptin, Hertikad) quantitative determination in biological fluids

Pisarev VV, Ivanov AV

Scientific and Production Center Probiotech LLC, Moscow, Russian Federation

Abstract. Relevance. Trastuzumab is the drug of choice for the HER2+ breast cancer treatment. To determine the trastuzumab pharmacodynamics in personalized therapy a validated bioanalytical method for measuring the concentration of the drug in biological fluids is required. The aim: creation and assessment of the suitability (validation) of a test system based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative determination of trastuzumab concentration in human serum/plasma. Materials and methods. The presented test system is a classic ELISA kit with a 96-well polystyrene plate, the wells of which are coated with monoclonal antibodies specific to trastuzumab, secondary goat antibodies to the Fc fragment conjugated with horseradish peroxidase (HRP), substrate solution — (3,5,3',5')-tetramethylbenzidine (TMB) and stop solution. Quality control solutions were prepared by diluting known concentrations of trastuzumab in blank serum. Results. In the course of the work the limit of detection (0.84 ng/ml) and the lower limit of quantitative determination (1.41 ng/ml) of trastuzumab in serum/plasma were established and the high selectivity of analyte determination in a multicomponent matrix was proved. The found average values of trastuzumab concentrations did not deviate from the nominal values by more than 14 % in the entire range of determined concentrations, the intra- and interseries precision of the test system did not exceed 8%, and the total method error was 20.1 %. The demonstrated dilution linearity allows the assay to be used to analyze a wide range of trastuzumab concentrations in biological samples. The stability of the components of the test system is defined as at least 1 year under storage conditions. Conclusion. The presented ELISA test system complies with international validation requirements and it is suitable for practical use.

Keywords: trastuzumab; ELISA; validation; pharmacokinetics

For citations:

Pisarev VV, Ivanov AV. Validation of ELISA Test-system for Trastuzumab (Herceptin, Hertikad) quantitative determination in biological fluids. *Farmakokinetika i farmakodinamika* = *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(1):58–64. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-1-58-64>

Received: January 02, 2023. **Accepted:** January 06, 2023. **Published:** March 24, 2023.

Введение / Introduction

Препараты, нацеленные на рецептор 2 типа эпидермального фактора роста человека (HER2), произвели революцию в лечении пациентов с HER2-положительными злокачественными опухолями молочной железы. Применение таргетных препаратов подобного типа поставило антираковую терапию на новый стандарт превосходных результатов выживаемости для данного агрессивного подтипа рака молочных желез (РМЖ), характеризующегося крайне негативным прогнозом [1–4]. В основе таких препаратов лежит трастузумаб, представляющий собой рекомбинантное моноклональное антитело из человеческих консервативных доменов и мышиных вариабельных последовательностей, связывающее внеклеточный домен белка HER2. Механизм действия трастузумаба заключается в значительном подавлении экспрессии HER2. Также он ускоряет эндоцитоз и деградацию рецептора и ингибирует прохождение клеточного цикла через образование комплексов p27Kip1/Cdk2 [5]. Трастузумаб, разработанный Genetic Engineering Technology, Inc. (США), в настоящее время выпускается под торговыми марками Герцептин® компанией F. Hoffmann-La Roche (Швейцария), Тразимера® компанией PFIZER (США) и Гертикад® компанией БИОКАД (Россия).

Для успешного клинического применения трастузумаба необходимо чётко представлять фармакогенетику препарата, особенно учитывая тот факт, что для каждого случая HER2-положительного РМЖ характерен индивидуальный уровень экспрессии гена *ERBB2*, кодирующего белок HER2. Одним из наиболее практичных способов количественной оценки уровня трастузумаба в крови пациента является применение метода иммуноферментного анализа (ИФА, enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Несмотря на наличие на рынке нескольких вариантов тест-наборов ИФА [6] для определения трастузумаба в биологических жидкостях, разработка отечественного продукта с аналогичными или превосходящими характеристиками является актуальной задачей. Для решения данной задачи в ООО «Научно-производственный центр Пробиотек» разработана и подготовлена к практическому применению тест-система на основе «сэндвич»-варианта твердофазного ИФА для количественного определения трастузумаба в биологических жидкостях. Ранее подобный подход был успешно применён для создания аналогичной тест-системы для определения ритуксимаба [7]. Выбор метода ИФА обусловлен явными преимуществами подобного подхода по сравнению с другими аналитическими методиками: возможностью количественного определения концентрации исследуемого вещества на основе калибровочной кривой, построенной для каждой постановки наряду с доступностью для использования в рутинной практике клинической

лаборатории, особенно по сравнению с методами иммунохемилюминисценции и масс-спектрометрии. К явным преимуществам представленной тест-системы можно отнести невысокую стоимость относительно зарубежных аналогов, возможность быстро наладить массовое производство, технические характеристики, оптимизированные для точного определения концентрации трастузумаба в терапевтических интервалах именно в крови человека.

Целью настоящего исследования является оценка характеристик и пригодности (валидация) данной тест-системы количественного определения трастузумаба в биологических жидкостях человека для последующего применения в области персонализированной фармакокинетики.

Материалы и методы / Materials and methods

Приготовление растворов. Для оценки концентрации трастузумаба в биологических жидкостях было приготовлено несколько вариантов растворов. Для построения калибровочной кривой были приготовлены растворы трастузумаба с концентрацией 3, 6, 30, 90, 160, 250, 300 нг/мл, полученные путём разбавления препарата Герцептин (Хоффман-Ля Рош, Швейцария) концентрацией 120 мг/мл в фосфатно-солевом буфере с добавлением бычьего сывороточного альбумина (БСА) и Твин 20.

Для проведения экспериментов по валидации метода было приготовлено 5 базовых образцов для контроля качества. Образцы для контроля качества с концентрацией трастузумаба 3, 8,5, 150, 225 и 300 нг/мл готовились аналогично калибровочным стандартам с применением в качестве разбавителя бланковой человеческой сыворотки. 10 образцов сыворотки были получены от Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Все измерения с применением биоматериалов человека проводились в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации 1975 года. Все доноры заполнили и подписали информированное согласие на участие в этом исследовательском проекте и на публикацию результатов.

Для эксперимента с определением предела чувствительности перед непосредственными измерениями образцы калибровочных растворов и бланковой сыворотки разбавлялись в 5000 раз в два этапа. Непосредственно перед анализом к 940 мкл сыворотки, разбавленной в 5000 раз, добавлялось 60 мкл раствора трастузумаба с концентрацией 10 нг/мл, далее смесь перемешивалась на вортексе.

Сыворотка с высоким содержанием липидов готовилась по следующей схеме: к 750 мкл бланковой сыворотки приливалось 250 мкл Интралипида 20 % (содержание фосфолипидов яичного желтка 12 г/л).

Выполнение процедуры ИФА проводилось по достаточно стандартной методике. Перед началом анализа

планшет, реакционные компоненты и исследуемые образцы выдерживались при комнатной температуре в течение 30 минут. В соответствующие лунки планшета добавлялось по 100 мкл калибровочных растворов, чистой бланковой сыворотки в качестве отрицательного контроля, бланковой сыворотки с добавлением трастузумаба до определённой концентрации в качестве положительного контроля, экспериментальных образцов сыворотки. Планшет заклеивали плёнкой, встряхивали в течение 2 минут на автоматическом шейкере при 500 об/мин и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Далее растворы удаляли и производилась промывка на автоматическом вошере HydroFlex (Tecan, Швейцария) 3 раза по 300 мкл с использованием промывочного буфера, содержащего 0,01 М фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с добавлением 0,05 % Твин-20. На втором этапе в каждую лунку вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, содержащего козы поликлональные антитела против Fc фрагмента IgG человека с пероксидазой хрена (A0170, Sigma-Aldrich, США) в реакционном буфере 0,01 М ФСБ и 1 % бычьего сывороточного альбумина. Далее следовала вторая отмычка 3 раза по 300 мкл промывочного буфера на автоматическом вошере. Следующим этапом следовало добавление 100 мкл раствора 3,3'; 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубация 15 минут в темноте при комнатной температуре. Реакция останавливалась добавлением 100 мкл стоп-раствора, содержащего 1 М серную кислоту. В течение 5 минут после остановки реакции производилась регистрация результатов ИФА с использованием микропланшетного фотометра MRX (Dynex Technologies Inc., США) при длине волны 450 нм.

Статистический анализ. Математическая обработка результатов измерений для валидации метода проводилась в соответствии с рекомендациями [8]. Для оценки таких параметров валидации, как среднее значение, стандартное отклонение, коэффициент вариации, правильность (относительная величина систематической погрешности), общая ошибка, а также для регрессионного анализа калибровочной зависимости и расчёта коэффициентов детерминации R^2 применялся пакет анализа стандартных статистических функций электронных таблиц Microsoft Excel 2007 (Статистический пакет Microsoft Office 97 для Windows, Редмонд, США) и онлайн-калькулятор для расчёта статистических критериев «Медицинская статистика» (<https://medstatistic.ru/calculators.html>). Детально процедура математической обработки с формулами описана в [7].

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Валидация теста определения трастузумаба производилась согласно рекомендациям Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации ЛС для человека (ICH) [9],

подтверждённым для применения в РФ [10]. Данная процедура включает 9 этапов [11]: селективность, точность, воспроизводимость, тест влияния матрицы, тест разбавления матрицы, тест разбавления образца, стабильность при трёх циклах замораживания—оттаивания (не менее $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), стабильность при стоянии образца при комнатной температуре в течение 6 часов, стабильность при долгосрочном хранении (не менее $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Первоначальным необходимым условием было построение и определение воспроизводимости калибровочной кривой. Результаты измерений представлены на рис. 1. При этом измерение концентраций трастузумаба выше 200 нг/мл методом твёрдофазного ИФА признано нецелесообразным ввиду выхода показателя оптической плотности на плато (рис. 1а). При этом с возрастанием концентрации оптическая плотность из-

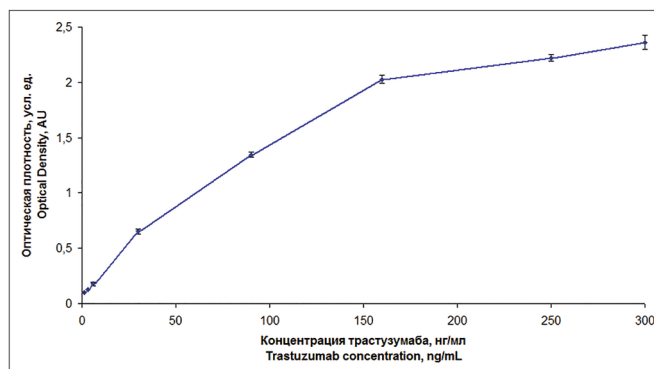


Рис. 1а. Зависимость оптической плотности от концентрации трастузумаба (калибровочная кривая)

Fig. 1a. Plot of optical density dependence on trastuzumab concentration (calibration curve)

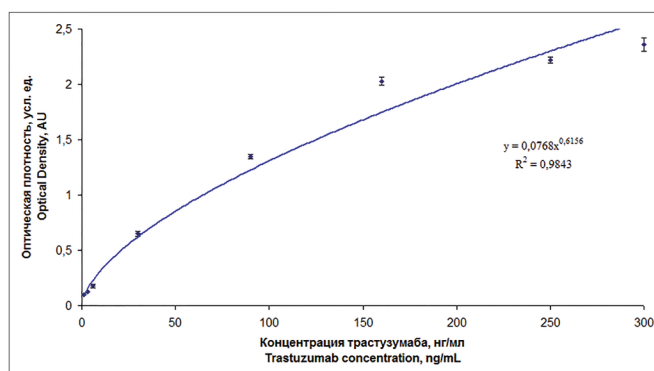


Рис. 1б. Регрессионная кривая при расчёте концентрации трастузумаба по использованным в создании тест-системы калибраторам в зависимости от полученных показателей оптической плотности

Fig. 1b. Regression curve when calculating the concentration of trastuzumab according to the calibrators used in the test system engineering depending on the optical density values obtained

меняется крайне незначительно, при этом её показатели не превышают значения 2,5, рекомендованного для точного определения измеряемого компонента [12, 13]. Особенности фармакокинетики трастузумаба являются ярко выраженный дозозависимый характер. При этом равновесная концентрация в крови пациента составляет 79–123 мкг/мл. Именно под такие значения подбирались оптимальные параметры разработанной тест-системы ИФА. Для построения калибровочной кривой в дизайне тест-системы было использовано 8 калибраторов с заданными значениями концентрации трастузумаба: 0 (бланковый образец), 3, 6, 30, 90, 160, 250, 300 нг/мл. При определении регрессионной модели наилучшие результаты показала квадратичная зависимость (рис. 16). Формулой пересчёта оптической плотности в концентрацию трастузумаба является:

$$y = 0,0768x^{0,6156}. \quad (1)$$

Величина достоверной аппроксимации R^2 составила 0,9843. При обратном расчёте концентраций калибровочных стандартов отклонения от теоретических значений попали в диапазон от –14,8 до 16,5 %, что не превосходит допустимые 20 % [13].

Для определения предела определения (ПО) и нижнего предела количественного определения (НПКО) были проанализированы 10 образцов бланковой сыворотки доноров. Полученное значение качественного ПО, вычисленное как полученное значение концентрации трастузумаба 0,09 нг/мл плюс три стандартных отклонения, составило 0,84 нг/мл. НПКО было

определено как 0,09 нг/мл плюс десять стандартных отклонений, что составило 1,41 нг/мл.

При измерениях тест-системы на точность и воспроизводимость были применены образцы сыворотки крови реальных доноров, в которые были добавлены известные концентрации трастузумаба. Всего подобным образом было изготовлено 5 базовых образцов контроля качества на сыворотках доноров с концентрациями трастузумаба 3, 8,5, 150, 225 и 300 нг/мл. При оценке вариаций внутри аналитической серии было проанализировано по 3 повтора для 3 комплектов образцов для контроля качества в сыворотке. Определённые в результате измерений средние значения концентраций трастузумаба не отклонялись от номинальных значений на более чем 11,42 % во всём диапазоне определяемых концентраций, при этом выявленная внутри- и межсерийная прецизионность тест-системы не превышала 11,31 %, общая ошибка метода — 20,0 % (табл. 1). Полученные значения с запасом укладываются в регламентные валидационные требования правильности в ± 20 % от номинального значения, прецизионности в 20 % и общей ошибки метода в 30 % [14]. Согласно полученным данным, можно сделать вывод, что прецизионность и точность результатов внутри аналитических серий и между сериями при выполнении тестов в одних и тех же стандартных условиях соответствует значениям в установленных пределах, что позволяет использовать данную методику для определения трастузумаба в сыворотке крови.

Таблица 1

Внутри- и межсерийная прецизионность, правильность и общая ошибка методики определения трастузумаба в сыворотке крови доноров

Table 1

Within-run and between-run precision, accuracy and total error of the method of trastuzumab determination in the donor's blood serum

Аналитические характеристики / Analytical characteristics	Образцы для контроля качества / Quality control samples				
	3 нг/мл ng/ml	8,5 нг/мл ng/ml	150 нг/мл ng/ml	225 нг/мл ng/ml	300 нг/мл ng/ml
<i>Стандартные измерения внутри аналитической серии (3 образца сыворотки доноров, 3 повтора для каждого образца) / Standard tests within analytical run (3 run, each sample in 3 replicates)</i>					
Среднее значение, мкг/мл / Mean, g/mL	2,91	8,26	143,3	199,3	273,6
Стандартное отклонение, мкг/мл / Standard deviation, g/mL	0,14	0,03	8,1	17,1	24
Прецизионность, % / Precision, %	4,81	0,36	5,65	8,58	8,77
Правильность, % / Accuracy, %	–3,00	–2,82	–4,47	–11,42	–8,80
Общая ошибка, % / Total error, %	7,81	3,19	10,12	20,00	17,57
<i>Стандартные измерения между аналитическими сериями (4 серии, 3 повтора для каждого образца) / Standard tests between analytical runs (4 runs, each sample in 3 replicates)</i>					
Среднее значение, мкг/мл / Mean, g/mL	3,1	7,9	162,8	211,8	283
Стандартное отклонение, мкг/мл / Standard deviation, g/mL	0,2	0,6	8,2	16,4	32
Прецизионность, % / Precision, %	6,45	7,59	5,04	7,74	11,31
Правильность, % / Accuracy, %	3,33	–7,06	8,53	–5,87	–5,67
Общая ошибка, % / Total error, %	9,78	14,65	13,57	13,61	16,97

При определении селективности была проанализирована способность аналитической методики давать правильный результат определения вещества в присутствии сопутствующих компонентов. В данном разделе изучения влияния матрицы и теста разбавления матрицы было использовано 10 различных источников бланковой сыворотки, в том числе гемолизной. Также было проведено измерение сыворотки с высоким содержанием липидов, полученной путём добавления в бланковую сыворотку 20 % интралипида, содержащего 12 г/л фосфолипидов яичного желтка. Всего было проведено 6 идентичных исследований. Результаты представлены на рис. 2. При сравнении полученных стандартных отклонений и прецизионности значений полученной оптической плотности, не превышающей 13,8 % становится ясно, что тест-система отвечает валидационным требованиям по селективности, для которой прецизионность не должна превышать 30 %.

Для осуществления тестов на стабильность было проведено три серии экспериментов. Во всех было использовано по 3 образца сыворотки со всеми 5 концентрациями трастузумаба в качестве образцов контроля качества. Для тестов на краткосрочную стабильность образцы сыворотки с трастузумабом экспонировались при 25 °C в течение 6 часов. При проведении теста на длительное хранение образцы были заморожены при –35 °C в течение 50 дней, после чего разморожены и измерены. Влияние замораживания–оттаивания было оценено после трёх циклов заморозки при –35 °C на 12 часов и оттаивания при 25 °C. Результаты представлены в табл. 2.

При осуществлении теста на линейное разбавление было проанализировано разбавление образца для

контроля качества концентрацией 600 мкг/мл реакционным буфером в 2, 4 и 8 раз. Затем все полученные растворы были разбавлены бланковой сывороткой в 5000 раз до концентраций 120, 60, 30 и 15 нг/мл и проанализированы в трёх постановках. Результаты представлены на рис. 3. Выявленная линейная регрессия представляет функцию:

$$y = 0,0099x + 0,308. \quad (2)$$

Величина достоверной аппроксимации R^2 составила 0,9843. При обратном расчёте концентраций калибровочных стандартов отклонения от теоретических значений попали в диапазон от –11,7 до 13,6 %, что не превосходит допустимые 20 % [13]. Обратно рассчитанные по формуле (1) концентрации трастузумаба не отклонялись от номинальных на более чем 13 % после пересчёта на разведение, а прецизионность конечных концентраций по всем разведениям не превышала 6 %.

Выводы / Conclusions

Проведённые валидационные процедуры подтверждают, что представленная методика количественного определения содержания трастузумаба в биологических жидкостях на основе твердофазного иммуноферментного анализа обладает высокой чувствительностью, специфичностью, воспроизводимостью и стабильностью. По всем международным требованиям [14, 15] методика, разработанная ООО «Научно-производственный центр Пробиотек», соответствует валидационным параметрам, предъявляемым для биоаналитических методов. Подтверждённые характеристики тест-системы позволяют использовать

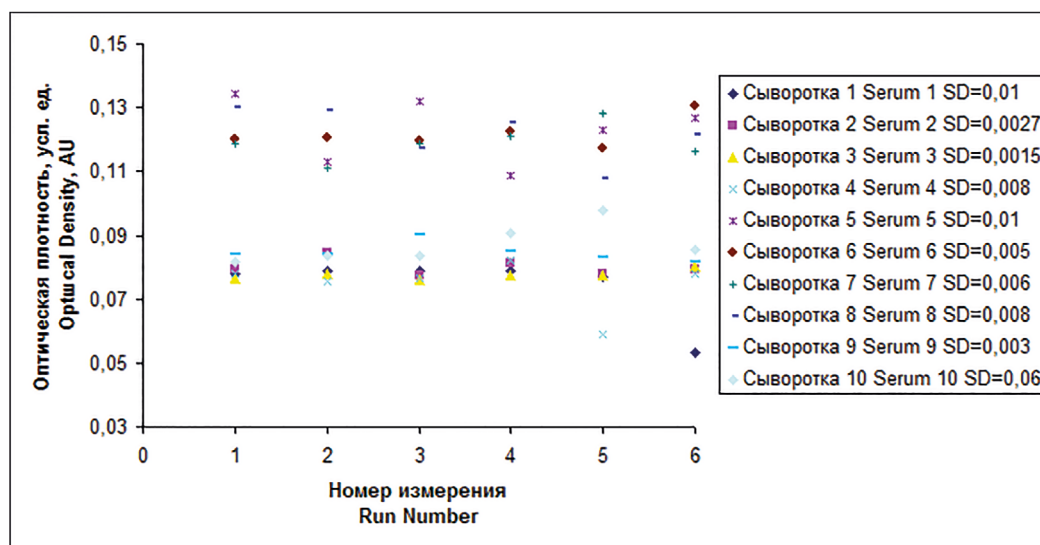


Рис. 2. Селективность тест-системы для 10 различных сывороток

Примечание: SD — стандартное отклонение для каждой сыворотки.

Fig. 2. Selectivity of the test system for 10 different sera.

Note: SD is the standard deviation for each serum.

Таблица 2

Влияние краткосрочного хранения, долгосрочного хранения при заморозке и трёх циклов замораживания–оттаивания на стабильность результатов измерения трастузумаба

Table 2

Effect of short-term storage, long-term freeze storage and three freeze-thaw cycles on the stability of trastuzumab measurements

Аналитические характеристики / Analytical characteristics	Образцы для контроля качества / Quality control samples				
	3 нг/мл ng/ml	8,5 нг/мл ng/ml	150 нг/мл ng/ml	225 нг/мл ng/ml	300 нг/мл ng/ml
<i>Исходное состояние (3 образца) / Initial state (3 samples)</i>					
Среднее значение, мкг/мл / Mean, µg/mL	2,87	7,67	149,93	194,63	293,45
Стандартное отклонение, мкг/мл / Standard deviation, µg/mL	0,3	0,05	2,34	2,32	6,58
Прецизионность, % / Precision, %	10,45	0,65	1,56	1,19	2,24
Правильность, % / Accuracy, %	–4,33	–9,76	–0,05	–13,50	–2,18
<i>Краткосрочное хранение 6 часов при 25 °C / Short term storage 6 hours at 25 °C</i>					
Среднее значение, мкг/мл / Mean, µg/mL	3,54	8,11	163	207	280
Стандартное отклонение, мкг/мл / Standard deviation, µg/mL	0,17	0,56	8	16	25
Прецизионность, % / Precision, %	4,80	6,91	4,91	7,73	8,93
Правильность, % / Accuracy, %	18,00	–4,59	8,67	–8,00	–6,67
<i>Длительное хранение при –35 °C в течение 50 дней / Long-term storage at –35 °C for 50 days</i>					
Среднее значение, мкг/мл / Mean, µg/mL	3,075	7,85	159,6	221,3	269,5
Стандартное отклонение, мкг/мл / Standard deviation, µg/mL	0,27	0,53	9,9	28,9	17,2
Прецизионность, % / Precision, %	8,78	6,75	6,20	13,06	6,38
Правильность, % / Accuracy, %	2,50	–7,65	6,40	–1,64	–10,17
<i>Три цикла замораживания/оттаивания при –35 °C на 12 часов / Three freeze/thaw cycles at –35 °C for 12 hours</i>					
Среднее значение, мкг/мл / Mean, µg/mL	3,46	8,21	157	205	272
Стандартное отклонение, мкг/мл / Standard deviation, µg/mL	0,19	0,6	7	18	26
Прецизионность, % / Precision, %	5,49	7,31	4,46	8,78	9,56
Правильность, % / Accuracy, %	15,33	–3,41	4,67	–8,89	–9,33

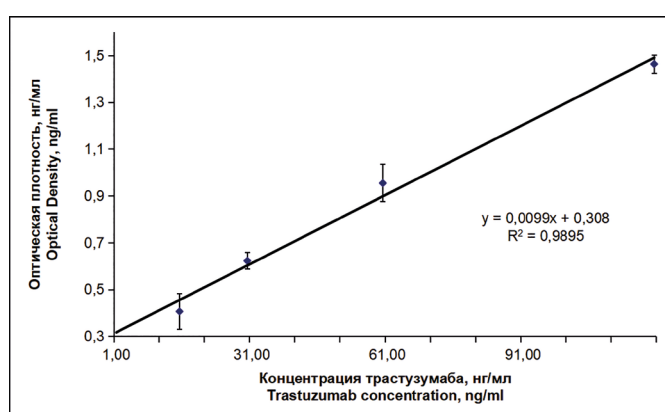


Рис. 3. Линейность разведения контрольного образца трастузумаба

Fig. 3. Linearity of trastuzumab control sample dilution

её для оценки фармакокинетики трастузумаба, в том числе при проведении персонализированной антираковой терапии пациентов.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов, требующих раскрытия в данной статье.

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

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Писарев Владимир Викторович

e-mail: vladimir.pisarev@probiotech.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3212-4369>

Генеральный директор ООО «Научно-производственный центр Пробиотек», Москва, Российская Федерация

Pisarev Vladimir V.

e-mail: vladimir.pisarev@probiotech.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3212-4369>

General manager, Scientific and Production Center Probiotech LLC, Moscow, Russian Federation

Иванов Андрей Владимирович**Автор, ответственный за переписку**

e-mail: gostyatin@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1676-7754>

с. н. с. ООО «Научно-производственный центр Пробиотек», Москва, Российская Федерация

Ivanov Andrei V.**Corresponding author**

e-mail: gostyatin@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1676-7754>

Senior Researcher, Scientific and Production Center Probiotech LLC, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

- Mendes D, Alves C, Afonso N, Cardoso F, Passos-Coelho JL, Costa L, Andrade S, Batel-Marques F. The benefit of HER2-targeted therapies on overall survival of patients with metastatic HER2-positive breast cancer—a systematic review. *Breast Cancer Res.* 2015;17:140. DOI: 10.1186/s13058-015-0648-2.
- Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: A meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer.* 2007;7:153. DOI: 10.1186/1471-2407-7-153.
- Swain SM, Miles D, Kim S-B, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): End-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2020;21:519–530. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30863-0.
- Eiger D, Agostinetto E, Saúde-Conde R, de Azambuja E. The Exciting New Field of HER2-Low Breast Cancer Treatment. *Cancers (Basel).* 2021 Mar 1;13(5):1015. DOI: 10.3390/cancers13051015.
- Bailey TA, Luan H, Clubb RJ, et al. Mechanisms of Trastuzumab resistance in ErbB2-driven breast cancer and newer opportunities to overcome therapy resistance. *J Carcinog.* 2011;10:28. DOI: 10.4103/1477-3163.90442.
- Maple L, Lathrop R, Bozich S, Harman W, Tacey R, Kelley M, Danilkovitch-Miagkova A. Development and validation of ELISA for herceptin detection in human serum. *J Immunol Methods.* 2004;295(1-2): 169–82. DOI: 10.1016/j.jim.2004.09.012.
- Писарев ВВ, Уляшова ММ, Гильдеева ГН. Валидация иммуноферментной тест-системы для доклинических исследований фармакокинетики ритуксимаба. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2019;9(2):131–139. [Pisarev VV, Ulyashova MM, Gildeeva GN. Validation of enzyme immunoassay for preclinical pharmacokinetic trials of rituximab. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2019;9(2):131–139. (In Russ).]. DOI: 10.30895/1991-2919-2019-9-2-131-139.
- Allinson JL. Clinical biomarker validation. *Bioanalysis.* 2018 Jun 1;10(12):957–968. DOI: 10.4155/bio-2018-0061.
- CPMP/ICH/3812/95. Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology. London: June 1995.
- Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / под ред. Н. В. Юргеля, А. Л. Младенцева, А. В. Бурдейна, М. А. Гетьмана, А. А. Малина. М.: Ассоциация российских фармацевтических производителей, 2007. [Rukovodstvo po validacii metodik analiza lekarstvennyh sredstv. Ed by NV Yurgel, AL Mladentsev, AV Bourdain, MA Hetman, AA Malin. Moscow, 2007. (In Russ).].
- Митькина ЛИ, Ковалева ЕЛ. Подходы к оценке пригодности аналитических методик при проведении экспертизы качества лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2012;(2):6–9. [Mit'kina LI, Kovaleva EL. Approaches to evaluation of analytical methods suitability when performing medicines quality evaluation. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya.* 2012;(2):131–139. (In Russ).].
- Tsurusawa N, Chang J, Namba M, et al. Modified ELISA for Ultrasensitive Diagnosis. *J Clin Med.* 2021;10(21):5197. DOI: 10.3390/jcm10215197.
- Crowther JR. The ELISA guidebook. *Methods Mol Biol.* 2000;149: III-IV, 1-413. DOI: 10.1385/1592590497.
- Guidance for Industry Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products. 2014. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM338856.pdf>.
- Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, et al. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biomed Anal.* 2008 Dec 15;48(5):1267–1281. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.09.020.

Яворский Александр Николаевич

к 75-летию со дня
рождения
от редакции



Доктор медицинских наук, профессор *Яворский Александр Николаевич* родился 19 апреля 1948 года в городе Винница. В 1972 году с отличием закончил лечебный факультет Винницкого медицинского института им. Н.И. Пирогова. С 1972 года по 1975 год работал ассистентом Винницкого медицинского института.

В 1975 году защитил диссертацию на соискание учёной степени кандидата медицинских наук в диссертационном совете НИИ фармакологии АМН СССР. В 1975 начал работу в должности младшего научного сотрудника лаборатории лекарственной токсикологии НИИ фармакологии АМН. С 1978 по 1987 год работал старшим научным сотрудником лаборатории лекарственной токсикологии. В 1987 году под руководством член-корреспондента РАМН Б.И. Любимова защитил диссертацию на соискание учёной степени доктора медицинских наук и был назначен на должность учёного секретаря НИИ фармакологии АМН СССР, которую занимал до 1991 года. С 1991 по 1996 год работал главным научным сотрудником лаборатории лекарственной токсикологии НИИ фармакологии РАМН. В 1994 году присвоено учёное звание профессор по специальности «фармакология».

В 1996 году назначен на должность руководителя отдела инструкций, приказов и номенклатуры Российского государственного центра экспертизы лекарств Минздрава России. С 1994 по 2000 год председатель комиссии по инструкциям и номенклатуре Фармакологического комитета Минздрава России. На основе опыта работы комиссии были разработаны научные подходы к формированию отечественной номенклатуры лекарств и подготовлена первая в отечественной литературе монография «Торговые наименования лекарственных препаратов».

В 1999 году назначен на должность учёного секретаря Научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств Минздрава России. С 2002 по 2013 год занимал должности руководителя отдела информационных стандартов, научно-аналитического отдела, отдела аспирантуры Научного центра экспертизы средств медицинского применения Минздрава России. В этот период принимал

активное участие в подготовке II тома Государственного реестра лекарственных средств «Типовые клинико-фармакологические статьи», Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, Руководства по экспертизе лекарственных средств. С 2013 по 2017 годы занимал должность учёного секретаря ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России.

С 1999 по 2017 годы ответственный секретарь журнала «Вестник научного центра экспертизы средств медицинского применения». В течение многих лет принимал активное участие в аттестации научных кадров являясь учёным секретарем диссертационного совета НИИ фармакологии РАН и членом диссертационного совета Волгоградского государственного медицинского университета Минздрава России и Всероссийского научного центра безопасности биологически активных веществ.

С 2017 по 2020 годы *Яворский А. Н.* занимал должность главного научного сотрудника лаборатории экспериментальной биомедицины Пущинского государственного естественно-научного института Минобрнауки России, а с 2020 года — главного научного сотрудника Научно-образовательного центра права и биоэтики в сфере геномных исследований и применения генетических технологий Московского государственного юридического университета имени О.Е. Кутафина Минобрнауки России. В этот период принимал активное участие в подготовке учебника «Фармацевтическое информирование», учебных пособий «Фармацевтическое право России» и «Генетические технологии».

Яворский А. Н. — фармаколог высшей квалификации, подготовил в качестве научного руководителя и научного консультанта 10 кандидатов наук, автор более 280 научных публикаций, 17 монографий и 5 учебных пособий.

Редакция журнала и коллеги-учёные поздравляют профессора А.Н. Яворского с юбилеем!