



Т.А. Батушвили 
Е.О. Чечетова  
П.В. Шадрин 
Н.П. Неугодова 

Определение биологической активности гонадотропинов на инбредных и аутбредных животных. Часть 1: Определение биологической активности фолликулостимулирующего гормона

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

✉ Чечетова Екатерина Олеговна; stepanuk@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Биологическая активность (БА) лекарственных средств может различаться в зависимости от способа их получения (биологические и рекомбинантные). Расширение номенклатуры гонадотропных препаратов, различия в способах их получения, невозможность замены биологических методов определения БА физико-химическими методами требуют совершенствования условий проведения испытаний с использованием лабораторных животных.

Цель. Анализ результатов определения биологической активности фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) на крысах различных линий для выбора оптимальных условий проведения испытания.

Материалы и методы. Определение БА проводили методом *in vivo*. Для сравнительного анализа были использованы результаты, полученные в течение нескольких лет при исследовании аутбредных и инбредных крыс на введение ФСГ. Во всех случаях использовали трехдозовый рандомизированный метод, основанный на определении БА испытуемого образца в сравнении с активностью стандартного образца (СО). В качестве СО использовали действующий стандарт Всемирной организации здравоохранения, содержащий 183 МЕ ФСГ и 177 МЕ ЛГ/амп. (кат. № 10/286). Испытание проводили на неполовозрелых крысах-самках аутбредных и инбредных линий Sprague Dawley и Wistar-Kyoto. В зависимости от выбора линии крыс менялись условия проведения выполнения испытания. Основными варьируемыми параметрами были тест-доза и количество животных в группах.

Результаты. Проведен сравнительный анализ реакции аутбредных и инбредных животных на введение растворов различных доз стандартного образца ФСГ и испытуемых образцов. Для крыс линии Wistar-Kyoto была выявлена относительно низкая дозозависимость в условиях сужения аналитического диапазона методики. Показано, что величина доз и длительность проведения испытания зависят от степени чувствительности животных. Разброс результатов при проведении испытания на инбредных крысах был меньше, чем в испытаниях на аутбредных животных. Статистический анализ результатов определения БА ФСГ показал, что выбор инбредных крыс позволяет вдвое уменьшить количество животных, взятых в испытание.

Выводы. Предложенный подход к проведению исследований биологической активности ФСГ позволяет сократить количество используемых животных при сохранении достоверности результатов и является экономически выгодным.

Ключевые слова: менотропины мочевые и рекомбинантные; фолликулостимулирующий гормон; лютеинизирующий гормон; гонадотропин хорионический человеческий; стандартные образцы; регрессионный и дисперсионный анализ

Для цитирования: Батуашвили Т.А., Чечетова Е.О., Шадрин П.В., Неугодова Н.П. Определение биологической активности гонадотропинов на инбредных и аутбредных животных. Часть 1: Определение биологической активности фолликулостимулирующего гормона. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(4):549–559. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-4-549-559>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

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

Tamara A. Batuashvili 
Ekaterina O. Chechetova 
Pavel V. Shadrin 
Natalia P. Neugodova 

Determination of Biological Activity of Gonadotrophins in Inbred and Outbred Animals. Part 1: Determination of Biological Activity of Follicle-Stimulating Hormone

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

✉ Ekaterina O. Chechetova; stepanuk@expmed.ru

ABSTRACT

Scientific relevance. The biological activity of medicinal products may vary depending on the method of production (i.e. biological or recombinant products). The widening variety of gonadotrophin preparations, the diversity of their production methods, and the irreplaceability of biological activity bioassays with physicochemical tests require improvement of animal testing conditions.

Aim. This study aimed to determine the biological activity of follicle-stimulating hormone (FSH) in several rat lines, analyse the findings, and select the most optimal testing conditions.

Materials and methods. The biological activity was determined using *in vivo* methods. The comparative analysis used test results obtained over several years in inbred and outbred rats treated with FSH. In all cases, the authors used a three-dose randomised method based on the determination of the biological activity of test samples by comparison with that of the WHO international standard (IS) containing 183 IU of FSH bioactivity and 177 IU of LH bioactivity per ampoule (NIBSC code: 10/286). The study included immature female rats, inbred (Wistar-Kyoto or Sprague Dawley) and outbred. Testing conditions depended on the selected rat line, with the main variables being the test dose and the number of animals per group.

Results. The authors compared responses of inbred and outbred rats to various doses of the FSH IS and test samples. Given the narrow range of the analytical procedure, Wistar-Kyoto rats showed a relatively weak dose–response relationship. The study demonstrated that the doses and testing duration depended on the sensitivity of the animals. Test results were less variable in inbred rats than in outbred ones. The statistical analysis of the results of FSH bioactivity testing in inbred and outbred rats showed that, with inbred rats, the number of animals could be halved without compromising the validity of the test.

Conclusions. The approach proposed in this study provides for testing the biological activity of FSH with fewer experimental animals, improved cost-effectiveness, and the same reliability of results.

Keywords: urinary menopausal gonadotrophins; recombinant menopausal gonadotrophins; follicle-stimulating hormone; luteinising hormone; human chorionic gonadotrophin; reference standards; regression analysis; analysis of variance

For citation: Batuashvili T.A., Chechetova E.O., Shadrin P.V., Neugodova N.P. Determination of biological activity of gonadotrophins in inbred and outbred animals. Part 1: Determination of biological activity of follicle-stimulating hormone. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2023;13(4):549–559. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-4-549-559>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D reporting No. 121021800098-4).

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

Введение

Для лечения заболеваний, связанных с гормональными нарушениями, и для проведения экстракорпорального оплодотворения, используют препараты, содержащие гормоны передней доли гипофиза: лютеинизирующий (ЛГ) и фолликулостимулирующий (ФСГ), а также вырабатываемый плацентой гонадотропин хорионический (ХГ). Перечисленные гормоны являются димерными гликопротеинами, состоящими из двух субъединиц α и β [1], при соединении которых гормон способен проявлять биологическую активность (БА). Строение α -субъединицы одинаковое у трех гормонов, β -субъединицы различаются по строению, определяют взаимодействие с рецепторами и специфическое биологическое действие каждого из гормонов [1, 2].

Первые препараты гонадотропинов были получены в середине XX в. биологическим путем из мочи беременных (человеческий гонадотропин хорионический (чГХ)) и женщин, находящихся в менопаузе (человеческий менопаузальный гонадотропин (чМГ)) [1, 3]. Недостатком этих препаратов, как считают исследователи, является содержание большого количества примесей в виде мочевых белков (урокиназа, эпидермальный фактор роста, трансферрин и др.) и ЛГ. Эти примеси снижают активность гормона, от которой зависит эффективность проводимого лечения [1, 4, 5]. Как отмечает Н.П. Гончаров, важно знать функциональное состояние гормона и (или) его БА (гормональную), так как «молекула гормона может иметь антигенные детерминанты, но не обладать биологической активностью» [6]. Отсутствие биологической активности приводит к нарушению процесса созревания фолликулов и овариальной стимуляции.

В последнее время наряду с высокоочищенными препаратами, получаемыми биологическим путем, появились гонадотропины рекомбинантные, синтез которых основан на экспрессии человеческого гена ФСГ в клетках яичников китайского хомячка (chinese hamster ovary, CHO) [4]. Полученный опыт применения генно-инженерных гормонов в лечебной практике показал, что их активность отличается от мочевых препаратов. A.N. Andersen и соавт. (2017) установили различия фармакодинамики рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (р-ФСГ) и высокоочищенного чМГ, связанные с разной степенью воздействия на эн-

докринную систему, развитие фолликулов, а также на качество полученных ооцитов [7]. В другом исследовании обнаружены различия в фармакокинетике этих гормонов. Так, для достижения одинакового клинического эффекта требовалось значительно меньшее количество ФСГ, выделенного из мочи женщин, чем аналогичного рекомбинантного гормона [8].

На величину БА гонадотропинов влияет собственная биологическим препаратам микрөгетерогенность. Часть исследователей считает, что основной причиной более низкой активности рекомбинантных гонадотропинов по сравнению с препаратами ФСГ природного происхождения являются отличия в характере и степени гликозилирования гормонов у грызунов в сравнении с человеком [1].

Поскольку посторонние примеси также могут оказывать влияние на величину активности, одной из задач производителей лекарственных средств является улучшение процесса очистки для получения препаратов природного происхождения с минимальным или нормированным содержанием примесей. Учитывая разнообразие выпускаемых гонадотропных препаратов и особенности их получения, определение БА гонадотропинов является обязательным, и только ее наличие способно гарантированно обеспечить эффективность препаратов.

В соответствии с фармакопейными требованиями определение активности лекарственных средств, содержащих ФСГ и ЛГ, возможно только биологическими методами с использованием лабораторных животных. Физико-химические методы позволяют получить информацию о структуре молекулы и определить количественное содержание гормонов в ЛП, но не позволяют оценить активность препарата. Появившиеся в последнее время на рынке наборы реактивов позволяют определять только количественное содержание ФСГ и ЛГ в крови человека, а не биологическую активность ЛП. Поэтому необходим поиск максимально надежных и экономически выгодных методов определения БА гонадотропинов.

Наиболее рациональным является применение иммунобиологических методов *in vitro*, что особенно актуально в связи с необходимостью сокращения количества лабораторных животных.

Например, в литературе описано использование иммуноферментного метода, основанного на взаимодействии ФСГ с рецепторами гранулезных клеток, отвечающих за выработку прогестерона в присутствии ФСГ¹. Метод является количественным, однако пока не используется для оценки качества лекарственных средств.

Испытания гонадотропинов на животных основаны на методе Steelman–Pohley [9], суть которого состоит в оценке влияния гормона на изменение размера половых органов. Для крыс-самок рассчитывают относительную массу яичников (ОМЯ) или матки, для самцов – комплекса добавочных половых желез. Определение активности ФСГ, в отличие от ЛГ, проводят только на крысах-самках и в качестве ответа рассчитывают ОМЯ. Для интерпретации результатов сравнивают полученные значения относительной массы органов животного, которому вводили испытуемый образец лекарственного средства (ИО), и животного, которому вводили соответствующий стандартный образец (СО) с точно установленной величиной БА.

Методики количественного определения БА для всех групп гонадотропинов представлены в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ)². В Европейской фармакопее 11.3 изд. определение БА гонадотропинов описано в частных монографиях на гонадотропин хорионический, фоллитропин и урофоллитропин³. Следует отметить, что согласно требованиям как ГФ РФ, так и Европейской фармакопеи определение проводят на аутбредных крысах. Однако для контроля качества гонадотропинов импортного производства нередко используют и инбредных крыс, как правило, двух линий: Wistar-Kyoto или Sprague Dawley.

Цель работы – анализ результатов определения биологической активности фолликулостимулирующего гормона на крысах различных линий для выбора оптимальных условий проведения испытания.

Материалы и методы

За рубежом в последние годы, учитывая принцип гуманного обращения с животными в эксперименте (принцип «3R»), активно осваивается использование инбредных крыс, что позволяет уменьшить не только количество используемых животных, но и вводимые дозы гормона. От выбора статуса животного зависят и другие параметры: курсовая доза, количество инъекций, длительность проведения испытания. При работе как по отечественной⁴, так и по зарубежной методикам, несмотря на их различия, используют трехдозовый рандомизированный метод, в основе которого лежит определение БА испытуемого образца в сравнении с активностью СО. В качестве СО использовали действующий стандарт ВОЗ⁵, содержащий 183 МЕ ФСГ и 177 МЕ ЛГ/амп. (кат. № 10/286).

Испытание проводили на неполовозрелых крысах-самках аутбредных⁶ и инбредных линий Sprague Dawley⁷ и Wistar-Kyoto⁸, массой (на начало опыта) 32–36 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Доступ к воде и пище был свободным. Все манипуляции на животных проводили в соответствии с требованиями нормативных документов⁹.

Животные были разделены на группы: инбредные по пять особей в группе, аутбредные – по десять. В качестве растворителя СО и ИО использовали альбумино-фосфатный буфер¹⁰, в который для получения оптимального ответа животного добавляли избыточное количество чХГ (70 МЕ/мл). Реакция на добавление чХГ является специфической при определении БА ФСГ за счет лютеинизирующей активности хорионического гонадотропина. В качестве ответа оценивали ОМЯ.

В каждом опыте в течение четырех дней трем группам животных подкожно вводили растворы СО в разных дозах (малая, средняя, большая), а трем другим – ИО соответственно. Величины курсовых доз, полученных каждым животным в течение опыта, зависели от выбранной

¹ Воробьев ИИ. Методы функциональной экспрессии генов, кодирующих фармацевтически значимые гликопротеины: дис. ... д-ра биол. наук. М.; 2019.

² ОФС.1.2.4.0014.18 Биологические испытания гонадотропинов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

³ Monograph 01/2020:0498 Gonadotrophin, Chorionic; Monograph 01/2020:0958 Urofollitropin; Monograph 01/2023:2285 Follitropin. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg; 2023.

⁴ ОФС.1.2.4.0014.18 Биологические испытания гонадотропинов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁵ https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/blood-products/catalogue/alphabetical-list.pdf?sfvrsn=15455482_2

⁶ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, Филиал «Андреевка».

⁷ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, Филиал «Столбовая».

⁸ Питомник лабораторных животных «Пушино».

⁹ СП 2.2.1.3218-14 Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). 2014.

ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными.

¹⁰ ОФС.1.2.4.0014.18 Биологические испытания гонадотропинов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

методики (табл. 1–3). На пятый день проводили эвтаназию и выделяли яичники. Очищенные и просушенные фильтровальной бумагой органы взвешивали и определяли ОМЯ. Результаты обрабатывали в соответствии с требованиями ГФ РФ¹¹. Величина БА во всех испытаниях соответствовала установленным требованиям.

Сначала был проведен сравнительный анализ реакции аутбредных и инбредных животных на введение СО с известной активностью. Сравнение проводили по следующим параметрам: степень дозозависимости, абсолютная величина ответов и интегральный показатель.

Степень дозозависимости определяется угловым коэффициентом линейной регрессии (b). Интегральный показатель представляет собой отношение s/b , где s – среднее квадратическое отклонение (корень квадратный из внутригруп-

повой дисперсии результатов испытания – s^2). Чем меньше дисперсия результатов в испытании и (или) чем больше угол наклона линии дозозависимости, тем более точны и воспроизводимы результаты. Регрессионный и дисперсионный анализ данных, а также вычисление БА гонадотропинов проводили с помощью электронных таблиц и программного обеспечения CombiStats.

Затем сравнили реакцию аутбредных и инбредных животных, полученную при испытаниях в целом, т.е. при учете данных как СО, так и ИО по интегральному показателю.

Результаты и обсуждение

Вначале были проанализированы данные, характеризующие реакции аутбредных и инбредных крыс (Sprague Dawley, Wistar-Kyoto) на введение растворов различных доз СО ФСГ. Величины

Таблица 1. Реакция аутбредных крыс-самок на введение стандартного образца фолликулостимулирующего гормона (ФСГ)

Table 1. Responses of female outbred rats to the international standard for follicle-stimulating hormone (FSH)

Курсовая доза ФСГ, МЕ/животное <i>Accumulated FSH dose, IU/animal</i>	Среднее значение относительной массы яичников (ОМЯ) и полуширина доверительного интервала ($\overline{ОМЯ} \pm \Delta ОМЯ$) при доверительной вероятности $P = 95\%$ <i>Average ovary-to-body weight ratio and confidence interval half-width ($\overline{ОМЯ} \pm \Delta ОМЯ$) (P = 95%)</i>
2,63	1,40±0,09
5,25	2,03±0,18
10,25	2,45±0,17

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Таблица 2. Реакция крыс-самок линии Sprague Dawley на введение стандартного образца фолликулостимулирующего гормона (ФСГ)

Table 2. Responses of Sprague Dawley female rats to the international standard for follicle-stimulating hormone (FSH)

Курсовая доза ФСГ, МЕ/животное <i>Accumulated FSH dose, IU/animal</i>	Среднее значение относительной массы яичников (ОМЯ) и полуширина доверительного интервала ($\overline{ОМЯ} \pm \Delta ОМЯ$) при доверительной вероятности $P = 95\%$ <i>Average ovary-to-body weight ratio and confidence interval half-width ($\overline{ОМЯ} \pm \Delta ОМЯ$) (P = 95%)</i>
1,00	1,26±0,12
2,00	1,73±0,22
4,25	2,12±0,25

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Таблица 3. Реакция крыс-самок линии Wistar-Kyoto на введение стандартного образца фолликулостимулирующего гормона (ФСГ)

Table 3. Responses of Wistar-Kyoto female rats to the international standard for follicle-stimulating hormone (FSH)

Курсовая доза ФСГ, МЕ/животное <i>Accumulated FSH dose, IU/animal</i>	Среднее значение относительной массы яичников (ОМЯ) и полуширина доверительного интервала ($\overline{ОМЯ} \pm \Delta ОМЯ$) при доверительной вероятности $P = 95\%$ <i>Average ovary-to-body weight ratio and confidence interval half-width ($\overline{ОМЯ} \pm \Delta ОМЯ$) (P = 95%)</i>
2,05	1,91±0,18
2,90	2,05±0,17
4,12	2,14±0,16

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

¹¹ ОФС.1.1.0014.15 Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

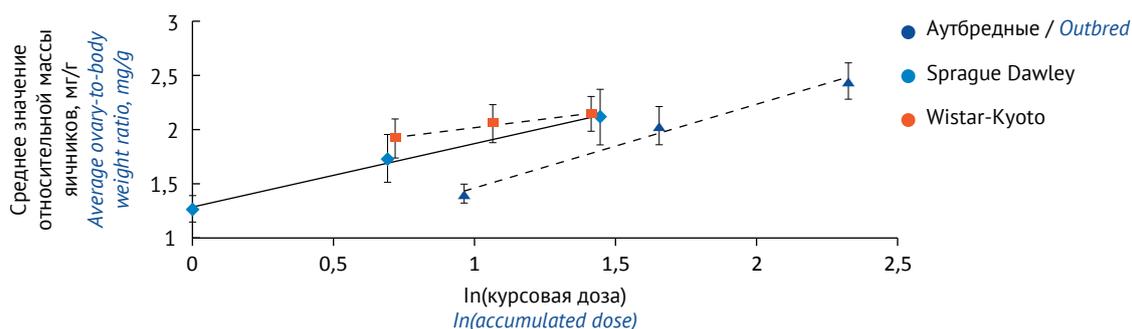


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Объединенная реакция самок аутбредных крыс, линии Sprague Dawley и линии Wistar-Kyoto на введение стандартного образца фолликулостимулирующего гормона с линейной аппроксимацией

Fig. 1. Pooled responses of female outbred, Sprague Dawley, and Wistar-Kyoto rats to the international standard for follicle-stimulating hormone, with linear approximation

курсовых доз и соответствующие ответы животных, в которых значения ОМЯ различались статистически незначимо, объединили и усреднили. Результаты представлены в *таблицах 1–3*.

Представленные данные демонстрируют прямую зависимость ОМЯ от курсовых доз. Установлено, что ответы инбредных крыс на введение курсовых доз близки к ответам аутбредных крыс. Следует отметить, что курсовые дозы, вводимые инбредным животным, примерно в 2 раза меньше доз, вводимых аутбредным. Это свидетельствует о том, что чувствительность инбредных животных выше, чем аутбредных.

Так как модель параллельных линий подразумевает наличие статистически значимой

линейной дозозависимости и незначимой непараллельности, а также наличие статистически значимого коэффициента регрессии b , характеризующего дозозависимость, для проверки выполнения этих условий провели дисперсионный и регрессионный анализ [10–12] зависимости ОМЯ от логарифма курсовых доз (рис. 1). Результаты дисперсионного анализа (табл. 4–6) показали значимость и линейность реакции аутбредных (табл. 4) и инбредных животных линии Sprague Dawley (табл. 5). Об этом свидетельствуют:

- значимость коэффициента регрессии b (наблюдаемые значения критерия Фишера (F -критерия), представляющего собой соотношение дисперсий, превышают критические

Таблица 4. Результаты оценки объединенной реакции аутбредных крыс самок на введение стандартного образца фолликулостимулирующего гормона методом дисперсионного анализа

Table 4. Analysis of variance of pooled responses of female outbred rats to the international standard for follicle-stimulating hormone

Определяемый показатель <i>Source of variance</i>	Число степеней свободы (f) <i>Number of degrees of freedom (f)</i>	Сумма квадратов <i>Sum of squares</i>	Средний квадрат <i>Mean square</i>	Значение критерия Фишера <i>Fisher test value</i>		Доверительная вероятность (P , %) <i>Confidence probability (P, %)</i>
				$F_{набл}$	$F_{критич}$	
Регрессия <i>Regression</i>	1	31,04	31,04	91,50	6,79	99
Отклонение от регрессии (нелинейность) <i>Departure from regression (non-linearity)</i>	1	0,34	0,34	1,01	3,90	95
Постановки (межгрупповая дисперсия) <i>Treatments (intergroup variance)</i>	2	31,39	15,69	46,26	3,05	95
Отклонение (дисперсия) <i>Error (intragroup variance)</i>	164	55,64	0,34			
Итого (Σ_{yy}) <i>Total (Σ_{yy})</i>	166	87,02	0,52			

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Таблица 5. Результаты оценки объединенной реакции самок крыс линии Sprague Dawley на введение стандартного образца фолликулостимулирующего гормона методом дисперсионного анализа**Table 5.** Analysis of variance of pooled responses of female Sprague Dawley rats to the international standard for follicle-stimulating hormone

Определяемый показатель <i>Source of variance</i>	Число степеней свободы (<i>f</i>) <i>Number of degrees of freedom (f)</i>	Сумма квадратов <i>Sum of squares</i>	Средний квадрат <i>Mean square</i>	Значение критерия Фишера <i>Fisher test value</i>		Доверительная вероятность (<i>P</i> , %) <i>Confidence probability (P, %)</i>
				<i>F</i> _{набл}	<i>F</i> _{критич}	
Регрессия <i>Regression</i>	1	14,14	14,14	32,39 > 6,88		99
Отклонение от регрессии (нелинейность) <i>Departure from regression (non-linearity)</i>	1	0,08	0,08	0,19 < 3,93		95
Постановки (межгрупповая дисперсия) <i>Treatments (intergroup variance)</i>	2	14,23	7,11	16,29 > 3,08		95
Отклонение (внутригрупповая дисперсия) <i>Error (intragroup variance)</i>	113	49,34	0,44			
Итого (Σ_{yy}) <i>Total (Σ_{yy})</i>	115	65,57	0,55			

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

для данного числа степеней свободы f при доверительной вероятности $P=99\%$);

- незначимость нелинейности (наблюдаемые значения F -критерия меньше критических для данного числа степеней свободы f при $P=95\%$).

Регрессионный анализ показал высокий коэффициент линейной регрессии: $b=0,76 \pm 0,16$, (аутбредные животные) и $b=0,59 \pm 0,20$ (инбредные животные) ($P=95\%$).

На основании данных дисперсионного и регрессионного анализа ответа животных линии Wistar-Kyoto на введение СО ФСГ было показано отсутствие значимой дозозависимости: наблюдаемое значение F -критерия меньше критического, а коэффициент линейной регрессии составил $b=0,33 \pm 0,34$ ($P=95\%$).

При исследовании объединенных реакций крыс-самок линии Wistar-Kyoto установлено, что диапазон вводимых доз был в два раза уже, чем при введении растворов СО ФСГ аутбредным крысам и крысам линии Sprague Dawley. Так, соотношение между дозами для животных линии Wistar-Kyoto составило 1:1,4, что значительно меньше, чем величина, указанная в методиках с применением других линий крыс (1:2)¹². В результате дозы, вводимые крысам линии Wistar-Kyoto, составляли в два раза меньший диапазон (рис. 1). На рисунке

показано, что три дозы, введенные крысам Wistar-Kyoto, расположены в интервале между средней и большой дозой для Sprague Dawley, а также малой и средней для аутбредных, что может свидетельствовать о высокой чувствительности животных линии Wistar-Kyoto к гормону. При этом реакция животных как линии Wistar-Kyoto, так и Sprague Dawley на сопоставимые дозы оказалась практически одинаковой.

На основании полученных результатов можно предположить, что вероятной причиной сравнительно низкой дозозависимости, полученной при исследовании реакции крыс линии Wistar-Kyoto на введение СО, является недостаточный охват диапазона эффективных доз. Вследствие сужения аналитического диапазона методики были получены результаты, неадекватно интерпретирующие реакцию животных. Так как испытания с иными дозами и с большей разницей между ними не проводили, линия Wistar-Kyoto была исключена из дальнейшего исследования.

Далее был проведен сравнительный анализ линий дозозависимости СО ФСГ аутбредных крыс и крыс линии Sprague Dawley. Различие между двумя линиями регрессии считают незначимым, если их угловые коэффициенты линейной регрессии b значимо не различаются. Это было проверено с помощью t -критерия (табл. 7), который можно применять, только если обе линии

¹² ОФС.1.2.4.0014.18 Биологические испытания гонадотропинов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

Таблица 6. Результаты оценки объединенной реакции самок крыс линии Wistar-Kyoto на введение стандартного образца фолликулостимулирующего гормона методом дисперсионного анализа

Table 6. Analysis of variance of pooled responses of female Wistar-Kyoto rats to the international standard for follicle-stimulating hormone

Определяемый показатель <i>Source of variance</i>	Число степеней свободы (f) <i>Number of degrees of freedom (f)</i>	Сумма квадратов <i>Sum of squares</i>	Средний квадрат <i>Mean square</i>	Значение критерия Фишера <i>Fisher test value</i>		Доверительная вероятность (P, %) <i>Confidence probability (P, %)</i>
				$F_{набл}$	$F_{критич}$	
Регрессия <i>Regression</i>	1	0,94	0,94	3,69<6,89		99
Отклонение от регрессии (нелинейность) <i>Departure from regression (non-linearity)</i>	1	0,02	0,02	0,08<3,94		95
Постановки (межгрупповая дисперсия) <i>Treatments (intergroup variance)</i>	2	0,96	0,48	1,88<3,09		95
Отклонение (внутригрупповая дисперсия) <i>Error (intragroup variance)</i>	103	26,23	0,25			
Итого (Σ_{yy}) <i>Total (Σ_{yy})</i>	105	27,18	0,26			

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Жирным шрифтом отмечены значения критерия Фишера, подтверждающие отсутствие значимой дозозависимости.
Note. Fisher test values given in bold indicate that there is no significant dose-response relationship.

характеризуются одной и той же дисперсией [11, 12]. Сравнение дисперсий проводили с помощью F -критерия. Различия дисперсий незначимы, так как $F_{набл} < F_{критич}$ ($P=95\%$), следовательно, можно сравнить линии на предмет параллельности и совпадения уровней (табл. 7).

Так как $t_{набл} < t_{критич}$ ($f=279$, $P=95\%$), линии дозозависимости СО ФСГ аутбредных крыс и крыс линии Sprague Dawley следует считать параллельными. Это позволило сравнить линии на предмет совпадения.

Установлено, что инбредные животные значительно сильнее реагируют на введение СО ФСГ (в среднем $d_{(инбр)-(аутбр)}=0,38$), несмотря на использование меньших доз. В то же время для аутбредных крыс величина интегрального показателя при исследовании реакции на СО оказалась меньше, чем для инбредных и составила соответственно 0,76 и 1,13 (табл. 8). Чем меньше данное значение, тем достовернее результаты, так как меньше разброс и выше дозозависимость. Однако в случаях определения БА ИО лекарственных средств разница интегральных показателей для аутбредных и инбредных животных практически нивелировалась ($0,44 \pm 0,23$ и $0,47 \pm 0,31$ соответственно). Это можно объяснить тем, что исследования проводили в течение двух лет. Проведение исследований в течение такого длительного периода приводит к возникновению дополнительных переменных, таких

как различия между партиями крыс, поставляемых из разных питомников, влияние времени года и т.п., увеличивающих разброс статистических параметров, полученных при учете результатов испытаний СО.

При анализе тех же параметров, значения которых были получены в исследовании БА ИО лекарственных средств в сравнении с СО, разброс данных был меньше, а разница в интегральном показателе практически отсутствовала. Следует отметить, что при этом количество использованных инбредных животных было меньше, а общее количество учтенных ответов при этом составило для аутбредных – 337 и инбредных – 209. Таким образом, следует признать, что чувствительность инбредных крыс выше.

Закключение

На основании проведенного анализа установлено следующее:

- у инбредных крыс чувствительность к ФСГ больше, чем у аутбредных. Это позволяет использовать меньшее количество животных для определения статистически значимой биологической активности;
- ввиду большей чувствительности инбредных крыс для получения оптимальных ответов животным достаточно вводить меньшие дозы гормонов. Соотношение между дозами должно быть не менее 1:2.

Таблица 7. Сравнительный анализ линий регрессии, характеризующих реакцию крыс-самок аутбредных и линии Sprague Dawley на введение стандартного образца фолликулостимулирующего гормона**Table 7.** Comparative analysis of regression lines characterising responses of female outbred and Sprague Dawley rats to the international standard for follicle-stimulating hormone

Статус животных <i>Line</i>	Аутбредные <i>Outbred</i>	Sprague Dawley	
Угловой коэффициент линейной регрессии <i>b</i> <i>Slope, b</i>	0,76	0,59	
Дисперсия s^2 <i>Variance, s^2</i>	0,34	0,43	
Количество животных <i>N</i> <i>Number of animals, N</i>	167	116	
Среднее значение натурального логарифма курсовой дозы \bar{x} <i>Mean ln (accumulated dose) \bar{x}</i>	1,72	0,76	
Средний ответ \bar{y} , мг/г <i>Mean response, \bar{y}, mg/g</i>	82,01	81,73	
Сравнение дисперсий s^2 <i>Comparison of variances, s^2</i>			
$F_{набл} = 1,28$	<i>f</i> большей дисперсии <i>f, maximum variance</i>	<i>f</i> меньшей дисперсии <i>f, minimum variance</i>	Дисперсии статистически значимо не различаются <i>No significant difference between variances</i>
$F_{критич} = 1,32$ ($P=95\%$)	165	114	
Сравнение коэффициентов линейной регрессии <i>b</i> (оценка параллельности линий) <i>Comparison of slopes, b (parallelism estimation)</i>			
$t_{набл} = 1,39$	$f = 279$		
$t_{критич} = 1,97$ ($P=95\%$)	Линии параллельны <i>Lines are parallel</i>		
Сравнение линий на предмет совпадения <i>Comparison of lines for overlapping</i>			
$t_{набл} = 3,92$	$f = 279$		
$t_{критич} = 2,58$ ($P=99\%$)	Линии значимо не совпадают <i>No significant overlapping</i>		
$d_{(инбр)-(аутбр)} = 0,38$ мг/г			

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. *F* – критерий Фишера; *t* – критерий Стьюдента; *f* – число степеней свободы; *P* – доверительная вероятность; $d_{(инбр)-(аутбр)}$ – среднее расстояние между линиями дозозависимости, характеризующее разность реакции инбредных и аутбредных животных (мг/г).

Note. *F*, Fisher's test; *t*, Student's test; *f*, number of degrees of freedom; *P*, confidence probability; $d_{(инбр)-(аутбр)}$ average distance between dose-response lines for inbred and outbred animals (mg/g).

Выбор инбредных крыс позволяет уменьшить вдвое количество животных, взятых в испытание. При этом статистические параметры свидетельствуют о достоверности и надежности результатов, что подтверждает предпочтительное использование инбредных животных для определения биологической активности ФСГ. Результаты исследования будут учтены при пересмотре ОФС «Биологические испытания

гонадотропинов» для следующего издания отечественной фармакопеи.

Предложенный подход к проведению исследований биологической активности позволяет сократить количество используемых животных при той же достоверности получаемых результатов, экономически выгоден и согласуется с концепцией гуманного использования животных в эксперименте (принцип «3R»).

Таблица 8. Сводные показатели, характеризующие реакцию крыс-самок аутбредных и линии Sprague Dawley на введение стандартного образца фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лекарственного препарата ФСГ

Table 8. Summary statistics characterising responses of female outbred and Sprague Dawley rats to the international standard and test samples of follicle-stimulating hormone

Статус животных <i>Line</i>	Аутбредные <i>Outbred</i>	Sprague Dawley
Объединенная реакция на СО в среднем по всем испытаниям <i>Pooled responses to the IS averaged across all assays</i>		
Количество животных (N) <i>Number of animals (N)</i>	167	116
Угловой коэффициент линейной регрессии (b) <i>Slope (b)</i>	0,76±0,16	0,59±0,20
Интегральный показатель (s/b) <i>Standard deviation/slope ratio (s/b)</i>	0,76	1,13
В среднем по отдельным испытаниям (реакция на СО и ИО) <i>Average for individual assays (responses to the IS and test samples)</i>		
Количество животных (N) <i>Number of animals</i>	337	209
Интегральный показатель (s/b) (среднее значение ± полуширина доверительного интервала $\overline{s/b} \pm \Delta s/b$, P=95%) <i>Standard deviation/slope ratio (s/b)</i> <i>(mean ± confidence interval half-width $\overline{s/b} \pm \Delta s/b$, P=95%)</i>	0,44±0,23	0,47±0,31

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. СО – стандартный образец; ИО – испытуемый образец; s – среднее квадратическое отклонение; P – доверительная вероятность.

Note. IS, international standard; s, standard deviation; P, confidence probability.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Боярский КЮ. Влияние гликозилирования молекулы ФСГ на фолликулярную динамику и овариальную стимуляцию в программах ЭКО/ИКСИ. *Проблемы репродукции*. 2012;(4):40–4. Boyarsky KYu. Influence of glycosylation of FSH on follicular dynamics and ovarian stimulation in IVF/ICSI programs. *Russian Journal of Human Reproduction*. 2012;(4):40–4 (In Russ.). EDN: PIVFTL
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama. Gonadotropin preparations: past, present, and future perspectives. *Fertil Steril*. 2008;90(5 Suppl):S13–20. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.031>
- Абляева ЭШ, Бендусов ИА. Применение Мерионала и Альтерпура в программах вспомогательных репродуктивных технологий. *РМЖ. Мать и дитя*. 2016;24(5):312–6. Ablyayeva ESh, Bendusov IA. Merional and Alterpur in assisted reproductive technology programs. *RMJ. Mother and Child*. 2016;24(5):312–6 (In Russ.). EDN: WBAPIH
- Шпаков АО. Эндogenous и синтетические регуляторы периферических звеньев гипоталамо-гипофизарно-гонадной и -тиреоидной осей. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2020;106(6):696–719. Shpakov AO. The endogenous and synthetic regulators of the effector components of the hypothalamic-pituitary-gonadal and -thyroid axes. *Russian Journal of Physiology*. 2020;106(6):696–719 (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0869813920060126>
- Giudice E, Crisci C, Eshkol A, Papoian R. Composition of commercial gonadotrophin preparations extracted from human post-menopausal urine: characterization of non-gonadotrophin proteins. *Hum Reprod*. 1994;9(12):2291–9. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138440>
- Гончаров НП. Значение и роль методов определения гормонов в развитии эндокринологии как общепрофессиональной науки. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012;67(3):42–9. Goncharov NP. Significance and role of hormone detection methods in the development of endocrinology as a biological discipline. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2012;67(3):42–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.15690/vramn.v67i3.184>
- Andersen AN, Devroey P, Arce JC. Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial. *Hum Reprod*. 2006;21(12):3217–27. <https://doi.org/10.1093/humrep/del284>
- Mohamed MA, Sbracia M, Pacchiarotti A, Micara G, Linari A, Tranquilli D, et al. Urinary follicle-stimulating hormone (FSH) is more effective than recombinant FSH in older women in a controlled randomized study. *Fertil Steril*. 2006;85(5):1398–403. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.10.049>

9. Steelman SL, Pohley FM. Assay of the follicle-stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 1953;53(6):604–16.
<https://doi.org/10.1210/endo-53-6-604>
10. Burn JH, Finney DJ, Goodwin LG. *Biological standardization*. 2nd ed. London: Oxford University Press; 1952.
11. Glantz SA. *Primer of Biostatistics*. New York: McGraw-Hill; 1999.
12. Урбах ВЮ. *Биометрические методы. Статистическая обработка опытных данных в биологии, сельском хозяйстве и медицине*. М.: Наука; 1964.
Urbakh VYu. *Biometric methods. Statistical processing of experimental data in biology, agriculture, and medicine*. Moscow: Nauka; 1964 (In Russ.).

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Т.А. Батуашвили – планирование исследования, выполнение эксперимента, проведение сравнительного анализа полученных результатов; сбор данных литературы; Е.О. Чечетова – выполнение эксперимента, анализ полученных данных, систематизация и оформление результатов исследования, редактирование текста рукописи; П.В. Шадрин – проведение вычислений, выполнение сравнительного анализа полученных результатов, работа с графическим материалом; Н.П. Неугодова – основная идея исследования, редактирование текста рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Соответствие принципам этики. Проведение исследования было одобрено на заседании локального этического комитета ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (протокол заседания № 3 от 16.11.2023).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Tamara A. Batuashvili planned the study, conducted experiments, performed the comparative analysis of the results obtained, and collected literature data. Ekaterina O. Chechetova conducted experiments, analysed the data obtained, collated and formatted the study results, and edited the manuscript. Pavel V. Shadrin carried out calculations, performed the comparative analysis of the results obtained, and worked with the graphical material. Natalia P. Neugodova elaborated the main idea of the study, edited the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The study was approved at a meeting of the local ethics committee of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Minutes of Meeting No. 3 dated 16.11.2023).

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Батуашвили Тамара Ариеловна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2656-8131>

batuashvili@expmed.ru

Чечетова Екатерина Олеговна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6728-594X>

stepanuk@expmed.ru

Шадрин Павел Валерьевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7143-8227>

shadrin@expmed.ru

Неугодова Наталия Петровна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>

neugodova@expmed.ru

Поступила 16.08.2023

После доработки 19.09.2023

Принята к публикации 23.11.2023

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

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2656-8131>

batuashvili@expmed.ru

Ekaterina O. Chechetova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6728-594X>

stepanuk@expmed.ru

Pavel V. Shadrin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7143-8227>

shadrin@expmed.ru

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

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>

neugodova@expmed.ru

Received 16 August 2023

Revised 19 September 2023

Accepted 23 November 2023