

УДК 616.831-036.88-08-092.9:577.113.3+577.121

## Анализ данных с пропусками в экспериментальной медицине на примере постреанимационных нарушений обмена моноклеотидов

Золин П.П.<sup>1</sup>, Конвай В.Д.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 644099, Омск, ул. Ленина, д. 12

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина». 644008, Омск, Институтская площадь, д. 1

**Актуальность:** В экспериментальной медицине из-за гибели части подопытных животных от изучаемой патологии возникают пропуски в данных. Эти пропуски являются неслучайными и приводят к ошибкам в результатах и выводах исследований, поскольку обычные статистические методы для их обработки не подходят. Необходима разработка новых методов анализа неслучайных пропусков и проверка их применимости в медицинских исследованиях.

**Цель:** испытание ранее разработанного авторами метода анализа данных с неслучайными пропусками на примере исследования постреанимационных нарушений обмена моноклеотидов.

**Методы:** моделирование на крысах 6,5-минутной асфиксии и постреанимационной болезни, определение в головном мозге крыс содержания моноклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований, анализ их спектров. Обработка результатов с помощью статистической программы «CensMed», ранее созданной авторами.

**Результаты:** В первые 30 мин после начала реанимации в головном мозге крыс усиливается катаболизм моноклеотидов, накапливаются нуклеозиды и азотистые основания. В более поздние сроки постреанимационного периода из-за гибели части животных от изучаемой патологии возникает неопределенность в результатах сравнения оживленных крыс с контрольной группой. Уменьшить эту неопределенность и установить верхнюю и нижнюю границы возможного влияния пропусков удалось при помощи предложенного авторами метода. Определены ограничения, присущие нашему методу.

**Заключение:** Результаты исследований, содержащих неслучайные пропуски, следует обрабатывать не обычными, а специальными статистическими методами.

**Ключевые слова:** моноклеотиды; нуклеозиды; азотистые основания; данные с пропусками; неслучайные пропуски; реанимация; головной мозг.

**Для цитирования:** Золин П.П., Конвай В.Д. Анализ данных с пропусками в экспериментальной медицине: на примере постреанимационных нарушений обмена моноклеотидов. *Патогенез*. 2019; 17(3): 74-82

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2019.03.74-82

**Для корреспонденции:** Золин Петр Петрович, e-mail: zolin\_petr@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 11.01.2019

## Analysis of missing data in experimental medicine: an example of postresuscitation disorders in mononucleotide metabolism

Zolin P.P.<sup>1</sup>, Konvai V.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Omsk State Medical University  
Omsk, Russian Federation

<sup>2</sup> P.A. Stolypin Omsk State Agrarian University  
Omsk, Russian Federation

**Background:** In experimental medicine, some values may be missing from the data due to death of a part of experimental animals from the study pathology. These missing values are not accidental and lead to errors in results and conclusions of the studies, since conventional statistical methods are not suitable for them. It is necessary to develop new methods for analyzing missing data and testing their applicability in medical studies.

**Aim:** Testing a previously developed analytical method for samples with non-random, missing values on an example of a study of postresuscitation disorders in mononucleotide metabolism.

**Methods:** Modeling 6.5-min asphyxia and postresuscitation disease in rats; measurement of mononucleotides, nucleosides and nucleobases in the rat brain; and analysis of their arrays. Processing of results using a CensMed statistical software previously created by the authors.

**Results:** In the first 30 minutes after starting the resuscitation, mononucleotide catabolism increased in the rat brain, which resulted in accumulation of nucleosides and nucleobases. In later post-resuscitation periods, due to death of a part of animals from the study pathology, comparison of resuscitated rats with the control group became ambiguous. Using the method

---

previously proposed by the authors it appeared possible to reduce this ambiguity and to establish upper and lower limits for possible influence of the missing values. The authors defined limitations of the proposed method.

**Conclusion:** The results of studies including non-random, missing values should be processed with special rather than regular statistical methods.

**Key words:** mononucleotides; nucleosides; nucleobases; missing data; non-random missing data; resuscitation; brain.

**For citation:** Zolin P.P., Konvai V.D. [Analysis of missing data in experimental medicine: an example of postresuscitation disorders in mononucleotide metabolism]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2019; 17(3): 74-82 (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2019.03.74-82

**For correspondence:** Zolin Petr Petrovich, **e-mail:** zolin\_petr@mail.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** 11.01.2019

## Введение

В экспериментальной медицине предметом изучения нередко являются тяжелые заболевания, от которых часть подопытных животных погибает. Если интересующие исследователя показатели (биохимические, морфологические и т.д.) не чувствительны к посмертным изменениям, то он может взять органы умерших животных и исследовать их наряду с органами выживших особей, которых он подверг эвтаназии по прошествии нужного ему срока болезни. Тогда, кроме решения других задач работы, можно получить ответ на вопрос: с высоким или с низким уровнем изучаемого показателя преимущественно умирают животные от данной болезни? Но, как правило, показатели организма, интересующие современную медицину, настолько лабильны, что для их корректного измерения требуется эвтаназия и специальный забор материала. Поэтому исследователь при статистической обработке результатов обычно не принимает во внимание погибших животных, мотивируя тем, что они умерли и унесли с собой всю информацию об изучаемом показателе. Однако с точки зрения статистики неизвестные цифры умерших особей представляют собой пропуски в данных и их анализ необходим [1].

У подопытных животных измеряют не все подряд показатели, а те, которые имеют отношение к этиологии и/или патогенезу изучаемого заболевания. Это означает, что они хоть немного влияют на шансы организма умереть от него. Если какой-то параметр организма играет защитную роль, то больше шансов погибнуть от болезни будет у тех животных, которые изначально имели более низкие его уровни. Если же изучаемый параметр играет повреждающую (патогенетическую) роль, то с большей вероятностью будут умирать особи, у которых еще до моделирования болезни были более высокие значения этого параметра. Абсолютно одинаковых цифр изучаемого показателя у всех животных в группе не бывает, биологическая вариабельность — фундаментальный закон природы. Поскольку от болезни умирают животные не равновероятно (не случайно), а преимущественно с низкими или с высокими значениями изучаемого показателя, то их следует считать неслучайными пропусками (НП) в данных.

Когда в опытной группе вследствие моделирования болезни часть животных погибает, не дожив до эвтаназии, исследователь не знает, погибли особи с низкими

или с высокими уровнями показателя, например, концентрации изучаемого вещества в мозге. У доживших до эвтаназии животных исследователь может определить концентрацию интересующего его вещества в мозге, провести статистическую обработку и сравнить среднюю концентрацию опытной группы со средней концентрацией контрольной. Но от контрольной группы опытная отличается не только наличием болезни, но и тем, что в опытной группе часть цифровых значений (НП) отсеялась из-за смерти. Отсев НП привел к сдвигу среднего значения в опытной группе, причем неизвестно куда оно сдвинулось — увеличилось или уменьшилось. Этот сдвиг, вызванный НП, накладывается на вызванное болезнью изменение концентрации изучаемого вещества в мозге тех животных, которые дожили до эвтаназии. Исследователь думает, что отличие среднего уровня опытной группы от среднего уровня контрольной группы вызвано только действием изучаемой болезни, а на самом деле перед ним сумма влияний болезни и НП. Если не учитывать влияние НП, то это может привести к серьезным ошибкам в результатах и выводах исследования [1].

Проблема в том, как определить (статистически оценить) влияние НП на результаты исследования. Ведь о НП известен только факт их существования, но не цифровые значения. Несмотря на многолетнюю разработку методов анализа данных с НП [2-8], пока не создано достаточно эффективных решений для многих медицинских задач. Не случайно проблему НП назвали «занозой» для исследователей [3].

Нами был разработан метод статистической обработки данных с НП, основанный на анализе крайних случаев их возможного влияния [1, 9]. В настоящей работе мы хотим проверить эффективность нашего метода в исследовании уровней мононуклеотидов в мозге в постреанимационном периоде после 6,5-минутной механической асфиксии. Известно, что после 6,5 мин асфиксии часть крыс не удается реанимировать, и еще часть оживленных животных погибает в постреанимационном периоде [10]. Все эти потери можно считать НП, поскольку показатели метаболизма мононуклеотидов, которые мы собираемся определять в мозге крыс, играют существенную роль в патогенезе постреанимационной болезни [10, 11], а значит, влияют на шансы организма выжить или умереть.

Цель настоящей работы – биохимически определить и статистически оценить изменения показателей обмена мононуклеотидов в мозге в постреанимационном периоде с учетом пропусков в данных, вызванных гибелью животных от изучаемой патологии.

### Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 128 нелинейных белых крысах-самцах, получавших стандартный лабораторный рацион, при свободном доступе к воде и пище. Все опыты выполнены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными (European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimentation and other scientific purposes (ETS № 123, Strasbourg, 1986)).

Методика формирования групп подопытных животных в нашем исследовании включала использование простой рандомизации и плана параллельных групп. Известно, что метод простой рандомизации в достаточной мере гарантирует случайность разделения подопытных животных на группы, хотя и не обеспечивает равную численность групп [12]. Кроме того, неравное число животных в группах связано с тем, что нам было трудно спрогнозировать, сколько их погибнет на различных сроках постреанимационного периода.

Для моделирования клинической смерти и реанимации, крыс наркотизировали диэтиловым эфиром, фиксировали на лабораторном столике в положении на спине и интубировали полиэтиленовой трубкой диаметром 2 мм. Трубку фиксировали к верхней губе, полость рта тампонировали увлажненной салфеткой для исключения доступа воздуха в легкие иначе как через трубку. После установления ритмичного дыхания трубку перекрывали на 6,5 мин. Затем животных реанимировали при помощи непрямого массажа сердца и искусственного дыхания. Формировали группы, в которых проводили эвтаназию и забор головного мозга через 30 и 90 мин, 6 и 24 часов, 3, 7 и 21 суток после начала реанимации. Крыс группы «Контроль» подвергли не асфиксии и реанимации, а только контрольным манипуляциям: наркозу, фиксации, интубации.

Крыс выводили из эксперимента под эфирным наркозом путем погружения головы в жидкий азот до полного замораживания. Затем головы животных разрубали сагиттально при помощи охлажденного стального лезвия и молотка, быстро извлекали замороженный мозг, хранили его в жидком азоте. Не допуская оттаивания, гомогенизировали навеску мозга в охлажденной 6%-й хлорной кислоте ( $\text{HClO}_4$ ), взятой в пропорции 4 мл на 1 г мозга. Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 1000 g и 0°C. Супернатант немедленно нейтрализовали раствором КОН до pH = 7, выдерживали 15 мин при 0°C и осадок перхлората калия ( $\text{KClO}_4$ ) отделяли центрифугированием в течение 5 мин при 1000 g и 0°C. В полученном хлорнокислом экстракте ранее описанным методом [13] отделяли нуклеозиды и азотистые основания (НАО) от мононуклеотидов. Последние разделяли на две фракции: 1) нуклеозидди- и трифосфаты (НД-

ТФ) и 2) нуклеозидмонофосфаты (НМФ), поскольку они сильно различаются по скорости метаболизма и энергетическому значению [10, 11, 13]. Снимали спектры поглощения НДТФ, НМФ и НАО в области 230–300 нм, и определяли их концентрации, пересчитывая в единицы оптической плотности (ЕОП) на 1 г сырой массы мозга [13].

Базовую статистическую обработку результатов выполняли при помощи пакета «Statistica 6.0». Для каждой выборки (группы животных) вычисляли среднюю арифметическую и ее ошибку ( $\pm m$ ), медиану (Me), а также проводили проверку выборок на нормальность распределения. Обработку данных с учетом НП выполняли при помощи нашей статистической программы «CensMed» (номер ее государственной регистрации 50200900440 во ВНИИЦ, дата регистрации 13.05.2009 г., авторы: В.М. Лебедев, П.П. Золин, А.П. Мягчилов). Кроме того, в разделе «Результаты исследования» мы продемонстрировали сравнение групп по одному из алгоритмов программы «CensMed» вручную – для наглядности. В последнем случае уровни значимости p для критерия Манна-Уитни определяли по таблицам [14].

### Результаты исследования

Через 30 мин после начала реанимации в головном мозге крыс наблюдались статистически значимые изменения по сравнению с группой «Контроль» всех изученных нами показателей: концентрации НДТФ и НМФ снижались соответственно на 20% и 32%, уровень НАО повышался на 15% (таблица).

В течение первых суток постреанимационного периода содержание НДТФ имело тенденцию к снижению: через 90 мин после начала реанимации оно уменьшалось на 16% от уровня группы «Контроль», через 6 часов – на 14%, через 24 часа – на 13% (таблица). В более поздние сроки (через 3 суток, 7 суток, 21 сутки после реанимации) содержание НДТФ лишь слегка колебалось около контрольного уровня. Так же вело себя содержание НМФ, начиная с 90 мин после оживления и до конца периода наблюдений (таблица). Концентрация НАО в мозге через 90 минут после начала реанимации составила 106% от уровня группы «Контроль», через 6 часов – 105%, через 24 часа – 121%, через 3 суток – 109%, через 7 суток – 107%, через 21 сутки – 104% (таблица); однако ни в одном случае повышение уровня НАО не было статистически значимым.

Многие мононуклеотиды, нуклеозиды и азотистые основания имеют специфические особенности абсорбционных спектров в ультрафиолетовой области [15], что используется для их анализа. Известно, что в головном мозге, как и в других органах, пуриновые мононуклеотиды превосходят по концентрации все прочие свободные нуклеотиды – пиримидиновые, пуриновые [16–18]. Спектральный анализ проб НДТФ показал, что во всех пробах имеется единственный максимум поглощения, приходящийся на 260 нм. Это указывает на преобладание среди НДТФ аденозинтрифосфата и аденозиндифосфата в мозге как контрольных, так и реанимированных крыс.

Что касается фракции НМФ, то ее спектры в ближней ультрафиолетовой области (230–300 нм), а также отношения абсорбции  $A$  при разных длинах волн ( $A_{250}/A_{260}$ ,  $A_{280}/A_{260}$  и  $A_{290}/A_{260}$ ) существенно различались в мозге контрольных и оживленных крыс, свидетельствуя о возрастании в постреанимационном периоде относительных количеств гуанозинмонофосфата и инозинмонофосфата по сравнению с аденозинмонофосфатом.

При анализе спектров НАО в диапазоне 230–300 нм обращает на себя внимание увеличение отношений абсорбций  $A_{280}/A_{260}$  и  $A_{290}/A_{260}$  соответственно до значений 0,94 и 0,56 в группе «90 мин после реанимации», до 0,95 и 0,56 в группе «6 часов после реанимации», и до 0,96 и 0,56 в группе «24 часа после реанимации», что выше уровней контрольной группы (0,85 и 0,48). Это свидетельствует об увеличении относительных количеств гуанина и ксантозина в составе фракции НАО через 90 мин – 24 часа после реанимации. В группе «24 часа после реанимации», кроме того, отношение  $A_{250}/A_{260}$  возросло до 1,31 против 1,27 в контроле, что указывает на дополнительное повышение доли инозина. В группах «3 суток после реанимации» и «21 сутки после реанимации» обращает на себя внимание значительное увеличение только одного отношения –  $A_{290}/A_{260}$  (до 0,56 в обеих группах), что может свидетельствовать о возрастании доли урата во фракции НАО мозга.

Для того, чтобы показать в действии предложенный нами метод статистической обработки данных с НП [1, 9], мы должны использовать в качестве сред-

ней величины группы не  $\bar{X}$ , а  $Me$ . В тех группах, у которых средние больше всего отличаются от группы «Контроль» (табл.), проведем ручную статобработку результатов нашим методом.

По содержанию НДФФ сравним с контролем группу «6 часов после реанимации». В этой группе из 11 подвергнутых асфиксии и реанимации крыс не удалось оживить 3 особи, кроме того, в течение 6 часов после реанимации погибла еще 1. То есть всего до эвтаназии и забора мозга не дожили 4 животных. Какие у них были значения НДФФ, осталось неизвестным. Они представляют собой 4 НП.

Дожившие до забора мозга 7 крыс в группе «6 часов после реанимации» имеют следующие значения концентрации НДФФ в мозге, выстроенные в виде ранжированного ряда:

$$61, 64, 71, 77, 84, 87, 95 \quad (1)$$

В этом ряду  $Me$  выделена курсивом, она равна 77. Для удобства восприятия все значения мы округлили до целых.

Рассмотрим логически возможные крайности.

Сначала предположим, что в группе «6 ч после реанимации» погибли 4 крысы с самыми низкими содержаниями НДФФ в мозге. Поместим 4 пропуска (НП<sub>1</sub>, НП<sub>2</sub>, НП<sub>3</sub>, НП<sub>4</sub>) в начало ранжированного ряда (1). Получим восстановленный слева ранжированный ряд группы «6 часов после реанимации»:

$$\text{НП}_1, \text{НП}_2, \text{НП}_3, \text{НП}_4, 61, 64, 71, 77, 84, 87, 95 \quad (2)$$

$Me$  в восстановленном ранжированном ряду (2) равна 64, она выделена курсивом.

Таблица

Содержания нуклеозиди- и трифосфатов (НДФФ), нуклеозидмонофосфатов (НМФ), нуклеозидов и азотистых оснований (НАО) в головном мозге крыс, реанимированных после 6,5-минутной асфиксии,  $\bar{X}, \pm m$  ( $Me$ )

Группы животных	Содержания в головном мозге (ЕОП/г мозга)		
	НДФФ	НМФ	НАО
Контроль	89,3 ± 7,6 (87,0) <i>n</i> = 17	21,5 ± 1,4 (20,5) <i>n</i> = 17	70,4 ± 5,5 (74,0) <i>n</i> = 17
30 мин после реанимации	71,5 ± 9,0 (68,0) <i>n</i> = 11 <b><i>p</i> &lt; 0,05</b>	14,7 ± 1,3 (14,0) <i>n</i> = 11 <b><i>p</i> &lt; 0,005</b>	81,3 ± 4,9 (81,5) <i>n</i> = 12 <b><i>p</i> &lt; 0,05</b>
90 мин после реанимации	75,0 ± 8,1 (79,5) <i>n</i> = 4	19,8 ± 0,8 (19,6) <i>n</i> = 4	74,5 ± 8,5 (71,5) <i>n</i> = 4
6 часа после реанимации	77,0 ± 4,7 (77,0) <i>n</i> = 7	20,9 ± 0,7 (21,6) <i>n</i> = 6	74,1 ± 5,4 (67,0) <i>n</i> = 7
24 часа после реанимации	78,0 ± 3,7 (79,5) <i>n</i> = 6 <b><i>p<sub>r</sub></i> = 0,025</b>	22,1 ± 1,5 (22,2) <i>n</i> = 6	85,0 ± 10,3 (79,0) <i>n</i> = 6
3 сут. после реанимации	84,3 ± 9,9 (77,5) <i>n</i> = 4	19,5 ± 2,0 (20,3) <i>n</i> = 5	76,4 ± 8,2 (73,0) <i>n</i> = 5
7 сут. после реанимации	90,3 ± 5,2 (96,0) <i>n</i> = 7	19,4 ± 1,0 (20,0) <i>n</i> = 7	75,1 ± 6,2 (81,0) <i>n</i> = 7
21 сут. после реанимации	89,4 ± 5,4 (87,0) <i>n</i> = 7	20,9 ± 0,6 (21,0) <i>n</i> = 7	72,9 ± 4,2 (70,0) <i>n</i> = 7

Примечания:  $\bar{X} \pm m$  – средняя арифметическая ± ошибка средней арифметической (в скобках  $Me$  – медиана группы),  $n$  – объем выборки (число животных в группе),  $p$  – значимость различий по критерию Манна-Уитни в сравнении с группой «Контроль»,  $p_r$  – значимость различий в форме распределения по критерию Вальда-Вольфовица в сравнении с группой «Контроль».

Чтобы сравнить по критерию Манна-Уитни группу «6 часов после реанимации» и группу «Контроль», построим общий ранжированный ряд из

значений этих двух групп и поместим 4 пропуска (НП<sub>1</sub> – НП<sub>4</sub>) в начало общего ранжированного ряда (слева):

«Контроль»					24	48	53				69			79
«6 часов»	НП <sub>1</sub>	НП <sub>2</sub>	НП <sub>3</sub>	НП <sub>4</sub>				61	64			71	77	

81	81		84		87	88		99	105	107	114	118	125	158
		84		87				95						

В этом ряду число инверсий равно 39, а различие групп «Контроль» и «6 часов после реанимации» по критерию Манна-Уитни имеет уровень значимости  $p = 0,005$ , определенный по таблицам [14].

Затем рассмотрим другой крайний вариант – что в группе «6 часов после реанимации» не дожили до эвтаназии и забора мозга 4 крысы с самыми высокими содержаниями НДТФ. Поместим 4 НП, вызванных гибелью животных от изучаемой патологии, в конец ранжированного ряда

(1). Получаем восстановленный справа ранжированный ряд:

61, 64, 71, 77, 84, 87, 95, НП<sub>1</sub>, НП<sub>2</sub>, НП<sub>3</sub>, НП<sub>4</sub> (3)

*Me* в восстановленном ряду (3) также выделена курсивом. Ее значение равно 87, оно не отличается от значения *Me* в группе «Контроль».

Чтобы еще раз сравнить группы «Контроль» и «6 часов после реанимации» по критерию Манна-Уитни, построим общий ранжированный ряд, в котором 4 пропуска (НП<sub>1</sub> – НП<sub>4</sub>) поставим в конце ряда – справа:

«Контроль»	24	48	53				69			79	81	81		84
«6 часов»				61	64			71	77				84	

87		88		99	105	107	114	118	125	158				
	87		95								НП <sub>1</sub>	НП <sub>2</sub>	НП <sub>3</sub>	НП <sub>4</sub>

Число инверсий в этом ряду равно 108, различие групп статистически незначимо [14].

В группе «24 часа после реанимации» не удалось реанимировать 2 крысы, и в течение 24 часов после реанимации погибли еще 2, то есть до забора мозга в общей сложности не дожили 4 животных. Поместив эти 4 НП сперва в начало ранжированного ряда (слева) цифровых значений НДТФ, а затем в конец его (справа), как описано выше, мы получили, что *Me* группы «24 часа после реанимации» находится в границах между цифрами 72 и 85, то есть она ниже, чем *Me* контрольной группы, равная 87 (табл). В одном из этих двух крайних случаев (*Me* = 72) различие с группой «Контроль» по критерию Манна-Уитни имеет уровень значимости  $p = 0,01$ , а в другом крайнем случае (*Me* = 85) различие с контролем статистически незначимо.

Аналогичное сравнение групп «24 часа после реанимации» и «Контроль» по содержанию НАО в мозге показало, что *Me* группы «24 часа после реанимации» находится в интервале, ограниченном значениями 78-96. В первом случае (*Me* = 78) различие с группой «Контроль» по критерию Манна-Уитни статистически незначимо, во втором крайнем случае (*Me* = 96) – различие с контролем значимо ( $p < 0,05$ ). Но и в том, и в другом случае имеет место превышение над уровнем *Me* в контрольной группе, равным 74.

Кроме того, мы сравнили контрольную и опытные группы при помощи критерия серий Вальда-Вольфовица, который выявляет различия распределений двух выборок. Нами использовался обычный вариант критерия Вальда-Вольфовица (описанный, например, в пособии [14]), никак не модифицированный нами для анализа пропусков. При помощи этого критерия было выявлено статистически значимое различие в распределениях между группами «24 часа после реанимации» и «Контроль» по содержанию в мозге НДТФ (табл). Различие в форме распределений выборок может представлять не меньший интерес, чем различие выборочных средних, поскольку свидетельствует об изменении структуры выборки (опытной группы) под действием изучаемой патологии. Возможно, в группе «24 часа после реанимации» погибли те особи, значения которых были до асфиксии более тесно перемешаны со значениями контрольной группы в общем ранжированном ряду. Если так, то после их гибели числа групп «24 часа после реанимации» и «Контроль» стали меньше перемешаны, на что и среагировал критерий Вальда-Вольфовица. Но это лишь предположение. Две выборки могут стать различными по их распределениям и без участия НП. Вопрос о том, могут ли результаты критерия Вальда-Вольфовица служить индикатором влияния НП на параметры выборки, нуждается в специальных

исследованиях. Можно, например, сформировать несколько опытных групп с разной длительностью асфиксии, а значит и с разной долей погибших от нее животных (НП). А затем проверить, зависит ли выраженность различий между контрольной и опытной группами по критерию Вальда-Вольфовица от доли НП в опытной группе?

### Обсуждение

Основываясь на данных о метаболизме мононуклеотидов в норме и при гипоксических состояниях [11, 16, 17], механизм их деградации в условиях нашего эксперимента представляется следующим образом. В нормоксических условиях нуклеозидтрифосфаты постоянно отдают для нужд клетки энергию концевых макроэргических связей и превращаются в нуклеозиддифосфаты, которые очень быстро превращаются обратно. С началом асфиксии обратное фосфорилирование нуклеозиддифосфатов тормозится из-за нехватки кислорода, их концентрация в клетке нарастает. Как следствие, равновесие в НМФ-киназных реакциях сдвигается вправо: из 2 молекул нуклеозиддифосфатов образуется 1 молекула НМФ и 1 молекула нуклеозидтрифосфата. Последний при гипоксии крайне нужен и поэтому быстро дефосфорилируется, отдавая энергию. Процесс повторяется многократно, в результате чего снижается концентрация НДТФ и увеличивается НМФ. Чтобы равновесие в НМФ-киназных реакциях и дальше было сдвинуто вправо, необходимо удаление НМФ. Этому способствует аденозинмонофосфатдеаминаза, которая активируется при закислении среды и уменьшении уровня гуанозинтрифосфата. Последний в мозге, наряду с аденозинтрифосфатом и креатинфосфатом, является ингибитором 5'-нуклеотидазы [16], поэтому при снижении концентраций перечисленных ингибиторов усиливается расщепление 5'-нуклеотидазой всех НМФ до нуклеозидов и рибозо-1-фосфата. Далее часть нуклеозидов распадается до азотистых оснований. Реутилизация НАО, в частности, гипоксантина, до мононуклеотидов протекает при этом недостаточно эффективно [11]. Как результат, в клетке снижаются уровни сначала НДТФ, а затем и НМФ.

Через 30 мин после реанимации мы как раз наблюдаем в мозге снижение уровней НДТФ и НМФ. Одновременное возрастание уровня НАО менее выражено, чем уменьшение концентраций мононуклеотидов (таблица), возможно вследствие выхода части НАО из клеток мозга в ликвор и кровь. Известно, что, клеточная мембрана и гематоэнцефалический барьер проницаемы для НАО, в отличие от мононуклеотидов [17, 18]. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными об активации катаболизма мононуклеотидов при различных гипоксических и ишемических состояниях мозга [16, 18–20].

В последующие сроки постреанимационного периода снижение уровня НДТФ по сравнению с группой «Контроль» перестает быть статистически значимым, а медианные значения групп приближа-

ются к контролю. Но мы не знаем, действительно ли это можно расценивать как процесс восстановления концентрации НДТФ в мозге? Возможно другое объяснение: крысы с изначально низкими содержаниями НДТФ в мозге оказались менее устойчивыми к асфиксии и постреанимационной болезни и поэтому чаще от них погибли. Выбывание из группы низких значений приводит к увеличению средней величины НДТФ в группе ( $\bar{X}$ ,  $Me$ ), даже если у каждого выжившего члена группы концентрация НДТФ в постреанимационном периоде не изменяется и восстановление уровня НДТФ в реальности не происходит.

Чтобы проверить это предположение, мы провели анализ крайних случаев возможного влияния НП. Рассмотрели маловероятный вариант, что погибшие крысы имели самые высокие концентрации НДТФ в мозге. Оказалось, что если бы эти гипотетические крысы с высочайшими уровнями НДТФ были живы и вошли бы в состав групп «6 часов после реанимации» и «24 часа после реанимации», то  $Me$  первой из названных групп, даже в этом случае, не превысила бы уровень  $Me$  контрольной группы, а  $Me$  группы «24 часа после реанимации» была бы ниже контроля. Следовательно, можно говорить о том, через 6–24 часов после реанимации имеется истинное снижение НДТФ, вызванное изучаемой патологией.

Учитывая метаболическую роль мононуклеотидов в норме и при гипоксических состояниях [10, 11, 16, 17], более вероятным представляется вариант, что животные с самыми низкими содержаниями НДТФ в мозге оказались наименее устойчивыми и погибли от асфиксии и постреанимационной болезни. Мы статистическим способом «воскресли» этих крыс с низкими цифрами НДТФ и включили их в состав групп «6 часов после реанимации» и «24 часа после реанимации» – получилось, что в этом случае  $Me$  двух указанных групп ниже контрольного уровня соответственно на 26% и 17% при высокой статистической значимости отличий от контроля ( $p = 0,005$  и  $p = 0,01$  соответственно).

Поясним статистический смысл приведенных цифр на примере воображаемого эксперимента на крысах, в котором сравниваются две группы, не имеющие пропусков (привычная для медиков ситуация). Предположим, что между  $Me$  этих двух групп выявлено различие в 20% ( $p = 0,05$ ). Эти цифры получены на двух конкретных эмпирических выборках, которые сравниваются. При многократном повторении данного эксперимента на других или даже на этих же самых крысах (если они остаются пригодными для эксперимента), то есть при многократном извлечении двух выборок из их генеральных совокупностей, цифры 20% и  $p = 0,05$  не воспроизведутся в точности, а будут колебаться в соответствии с законами теории вероятности. Но это не лишает исследователя права, обсуждая результаты проведенного конкретного эксперимента, говорить о том, что в нем обнаружено различие между  $Me$  групп, равное 20%, при уровне значимости  $p = 0,05$ . Именно так интерпретируются результаты опытов в экспериментальных науках.

Нужно только помнить о вероятностной природе  $Me$  и  $p$ . В нашем примере  $p = 0,05$  означает, что вероятность ошибочного отвержения нулевой гипотезы (гипотезы о том, что различие между центрами распределения сравниваемых выборок равно нулю) составляет 0,05.

Точно так же, в рассмотренном выше примере НДФ в группе «6 часа после реанимации» можно подставить вместо пропусков  $НП_1 - НП_4$  какие угодно цифры — все равно у данной конкретной группы  $Me$  не сможет выйти за границы 64-87 (восстановленные ранжированные ряды 2 и 3). При сравнении этой группы с группой «Контроль» по критерию Манна-Уитни при любых  $НП_1 - НП_4$  число инверсий останется в пределах 39-108, а границей уровня значимости  $p$  останется  $p = 0,005$ .

При анализе данных с пропусками некоторые авторы учитывают множественные сравнения [4, 5, 7, 8], когда замещают (импутируют) пропуски не одним, а несколькими способами, а именно: последним полным наблюдением, средним из полных наблюдений, наблюдением, наиболее похожим на пропуск по различным признакам (здесь целый ряд вариантов). Затем сравнивают полученные результаты и выбирают лучший способ импутации. Слабое место этого подхода в том, что «лучший» способ импутации часто не совпадает даже в близких по тематике исследованиях, поскольку неоднозначны критерии его выбора. Когда мы в настоящей работе вместо пропусков ставим символы  $НП_1 - НП_4$  (см. восстановленные ранжированные ряды 2 и 3), то мы, по сути, тоже проводим импутацию, но мы замещаем пропуски не цифровыми значениями изучаемого показателя, а их рангами в ранжированном ряду. Еще одно отличие нашего подхода в том, что мы не выбираем один лучший способ импутации из нескольких, а анализируем сразу два крайних (предельно возможных) варианта импутации.

Переход от цифровых значений изучаемого показателя к их рангам неизбежно сопровождается потерей части информации о выборке. Но только благодаря переходу к рангам становится возможным анализ НП, описанный в настоящей работе. Обычно исследователь-медик выбирает между параметрическими и непараметрическими методами, для чего проверяет нормальность распределения своих экспериментальных данных. В нашем методе анализа НП вопрос о таком выборе даже не стоит: все статистические характеристики и процедуры, основанные на нормальном или другом известном распределении изучаемого показателя, принципиально не совместимы с нашим методом. Так, в качестве средней величины группы мы используем  $Me$ , но в принципе не можем использовать  $\bar{X}$ .

Можно выделить 3 главных достоинства и 3 недостатка нашего метода анализа НП.

Достоинства:

1. Достоинством метода является, как нам кажется, его логическая обоснованность. В отличие от методов импутации пропусков цифровыми зна-

чениями, идея нашего метода состоит в том, чтобы от цифровых значений перейти к их рангам, а затем определить верхний и нижний пределы возможного влияния НП на медиану группы и на результаты сравнения средних тенденций двух групп ранговыми методами.

2. Очевидным достоинством нашего метода является то, что погибшие от изучаемой патологии животные, о которых исследователи обычно забывают или не знают, что с ними делать, оказываются включенными в статистическую обработку результатов, и численность группы (объем выборки) увеличивается на их количество.

3. Методический подход, который мы предлагаем, хорош еще тем, что результаты статобработки не зависят от закона распределения изучаемого показателя и для анализа влияния НП может быть использован не только критерий Манна-Уитни, но и другие непараметрические ранговые методы.

Недостатки:

1. Самым серьезным недостатком обсуждаемого метода мы считаем то, что при значительной доле НП в группе он дает слишком широкий интервал возможного влияния НП на медиану группы ( $Me$ ) и на результаты сравнения групп. В таком случае приходится предполагать наиболее вероятное направление сдвига, вызванного НП, руководствуясь уже не формально-логическими, а содержательными соображениями — физиологической или патологической ролью изучаемого показателя.

2. Недостатком, а точнее ограничением, является то, что наш метод не позволяет оценить влияние НП на  $Me$  группы, если число пропусков превышает 50% от исходного числа животных в этой группе. Поэтому мы ничего не можем сказать о  $Me$  группы «3 суток после реанимации», в которой из 18 взятых в опыт крыс 4 не удалось реанимировать, а 7 погибли в течение 3 суток постреанимационного периода, не дожив до эвтаназии и забора мозга. В группе «7 суток после реанимации» число не оживших при реанимации и погибших в постреанимационном периоде крыс составляет соответственно 5 и 9 из 21 животных, взятых в опыт, а в группе «21 сутки после реанимации» — соответственно 6 и 11 из 24 крыс, взятых в опыт. Для всех трех перечисленных групп наш метод анализа НП не пригоден.

3. И наконец, предложенный нами метод позволяет оценить влияние НП на квартили группы только в том случае, если в группе погибло не более 25% от исходного числа животных. В настоящей работе число погибших крыс во всех группах превышает 25%, поэтому мы не стали включать значения квартилей и межквартильного размаха в таблицу результатов.

Заметим, что в медицинских исследованиях, помимо НП, могут возникать еще и случайные пропуски в данных, например, нечаянная утрата части биоматериала. Так, в нашем эксперименте случилась разморозка нескольких проб мозга во время хранения. Нужно стремиться к тому, чтобы подобные пропуски оставались действительно случайными и не

превращались в НП, влияющие на результаты исследования. Для этого необходимо проводить хранение и обработку материала не по группам, а попеременно, соблюдая рандомизацию на всех этапах работы.

### Заключение

Во время клинической смерти и в первые 30 мин после начала реанимации в головном мозге крыс усиливается катаболизм НДФ и НМФ, что приводит к увеличению уровня НАО. На более поздних сроках постреанимационного периода гибель части животных от изучаемой патологии (НП) вносит неопределенность в результаты сравнения оживленных крыс с контрольной группой. В тех случаях, когда доля НП в группе не очень высока, удается уменьшить эту неопределенность и установить верхнюю и нижнюю границы возможного влияния НП на результаты исследования при помощи ранее предложенного нами метода. Но наш способ имеет ограничения в применимости. Необходима дальнейшая разработка статистических методов анализа НП и испытание их в медико-биологических исследованиях.

### Список литературы

1. Золин П.П. Цензурированные данные и данные с пропусками в медицинских исследованиях. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2010; 54(4): 49–52.
2. Baker S.G., Fitzmaurice G.M., Freedman L.S., Kramer B.S. Simple adjustments for randomized trials with nonrandomly missing or censored outcomes arising from informative covariates. *Biostatistics*. 2006; 7(1): 29–40. DOI: 10.1093/biostatistics/kxi038
3. Graham J.W., Hofer S.M., Piccinin A.M. Analysis with missing data in drug prevention research. *NIDA Res. Monogr.* 1994; 142: 13–63.
4. Krantz M.J., Kaul S. The ATLAS ACS 2–TIMI 51 Trial and the burden of missing data (Anti-Xa therapy to lower cardiovascular events in addition to standard therapy in subjects with acute coronary syndrome ACS 2–Thrombolysis in myocardial infarction 51). *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013; 62(9): 777–781. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.05.024
5. Little R.J., D'Agostino R., Cohen M.L., Dickersin K., Emerson S.S., Farrar J.T., Frangakis C., Hogan J.W., Molenberghs G., Murphy S.A., Neaton J.D., Rotnitzky A., Scharfstein D., Shih W.J., Siegel J.P., Stern H. The prevention and treatment of missing data in clinical trials. *New Engl. J. Med.* 2012; 367: 1355–1360. DOI: 10.1056/NEJMSr1203730
6. Seitz C., Lanius V., Lippert S., Gerlinger C., Haberland C., Oehmke F., Tinneberg H.-R. Patterns of missing data in the use of the endometriosis symptom diary. *BMC Womens Health*. 2018; 18(1): 88. DOI: 10.1186/s12905-018-0578-0
7. Tsiatis A.A. *Semiparametric theory and missing data*. New York: Springer, 2006. 383 p.
8. Witkiewitz K., Falk D.E., Kranzler H.R., Litten R.Z., Hallgren K.A., O'Malley S.S., Anton R.F. Methods to analyze treatment effects in the presence of missing data for a continuous heavy drinking outcome measure when participants drop out from treatment in alcohol clinical trials. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2014; 38(11): 2826–2834. DOI: 10.1111/acer.12543
9. Золин П.П. Проблема цензурированных выборок в экспериментальной медицине. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2000; 44(1): 23–25.
10. Zolin P.P., Konvai V.D. Disturbances of hypoxanthine metabolism in the liver of resuscitated rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1997; 124(6): 1180–1182.
11. Золин П.П., Лебедев В.М., Конвай В.Д. *Математическое моделирование биохимических процессов с применением регрессионного анализа*. Омск: Издательство Омского государственного университета, 2009. 344 с.
12. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. *Математическая статистика в клинических исследованиях*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 304 с.

13. Золин П.П., Конвай В.Д., Домрачев А.А. Фракционирование пуриновых производных в изучении энергетического обмена. *Вестник Омского университета*. 2017; 22(1): 65–70.
14. Гублер Е.В., Генкин А.А. *Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях*. Л.: Медицина, 1973. 143 с.
15. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*. Ed. by J.C. Lindon, G.E. Tranter, D.W. Koppenaal. 3rd ed. Amsterdam: Academic Press, 2017. 3584 p.
16. Хватова Е.М., Сидоркина А.Н., Миронова Г.В. *Нуклеотиды мозга: метаболизм и оценка при кислородном голодании*. М.: Медицина, 1987. 208 с.
17. Henderson J.F., Paterson A.R.P. *Nucleotide metabolism: an introduction*. Burlington: Elsevier Science, 2014. 304 p.
18. zur Nedden S., Doney A.S., Frenguelli B.G. Modulation of intracellular ATP determines adenosine release and functional outcome in response to metabolic stress in rat hippocampal slices and cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 2014; 128(1): 111–124. DOI: 10.1111/jnc.12397
19. Galinsky R., Davidson J.O., Dean J.M., Green C.R., Bennet L., Gunn A.J. Glia and hemichannels: key mediators of perinatal encephalopathy. *Neural Regen. Res.* 2018; 13(2): 181–189. DOI: 10.4103/1673-5374.226378
20. Liu R.Z., Fan C.X., Zhang Z.L., Zhao X., Sun Y., Liu H.H., Nie Z.X., Pu X.P. Effects of DI-3-n-butylphthalide on cerebral ischemia infarction in rat model by mass spectrometry imaging. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(11): 2451. DOI: 10.3390/ijms18112451.

### References

1. Zolin P.P. [Censored data and missing data in medical researches]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. [Pathological physiology and experimental therapy]*. 2010; 54(4): 49–52. (in Russian)
2. Baker S.G., Fitzmaurice G.M., Freedman L.S., Kramer B.S. Simple adjustments for randomized trials with nonrandomly missing or censored outcomes arising from informative covariates. *Biostatistics*. 2006; 7(1): 29–40. DOI: 10.1093/biostatistics/kxi038
3. Graham J.W., Hofer S.M., Piccinin A.M. Analysis with missing data in drug prevention research. *NIDA Res. Monogr.* 1994; 142: 13–63.
4. Krantz M.J., Kaul S. The ATLAS ACS 2–TIMI 51 Trial and the burden of missing data (Anti-Xa therapy to lower cardiovascular events in addition to standard therapy in subjects with acute coronary syndrome ACS 2–Thrombolysis in myocardial infarction 51). *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013; 62(9): 777–781. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.05.024
5. Little R.J., D'Agostino R., Cohen M.L., Dickersin K., Emerson S.S., Farrar J.T., Frangakis C., Hogan J.W., Molenberghs G., Murphy S.A., Neaton J.D., Rotnitzky A., Scharfstein D., Shih W.J., Siegel J.P., Stern H. The prevention and treatment of missing data in clinical trials. *New Engl. J. Med.* 2012; 367: 1355–1360. DOI: 10.1056/NEJMSr1203730
6. Seitz C., Lanius V., Lippert S., Gerlinger C., Haberland C., Oehmke F., Tinneberg H.-R. Patterns of missing data in the use of the endometriosis symptom diary. *BMC Womens Health*. 2018; 18(1): 88. DOI: 10.1186/s12905-018-0578-0
7. Tsiatis A.A. *Semiparametric theory and missing data*. New York: Springer, 2006. 383 p.
8. Witkiewitz K., Falk D.E., Kranzler H.R., Litten R.Z., Hallgren K.A., O'Malley S.S., Anton R.F. Methods to analyze treatment effects in the presence of missing data for a continuous heavy drinking outcome measure when participants drop out from treatment in alcohol clinical trials. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2014; 38(11): 2826–2834. DOI: 10.1111/acer.12543
9. Zolin P.P. [Problem of censored samples in experimental medicine]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. [Pathological physiology and experimental therapy]*. 2000; 44(1): 23–25. (in Russian)
10. Zolin P.P., Konvai V.D. Disturbances of hypoxanthine metabolism in the liver of resuscitated rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1997; 124(6): 1180–1182.
11. Zolin P.P., Lebedev V.M., Konvai V.D. *Mathematical modelling of the metabolic processes with the use of regression analysis*. Омск: Izdatel'stvo Омского gosudarstvennogo universiteta, 2009. 344 p. (in Russian)

- 
12. Sergienko V.I., Bondareva I.B. [*Mathematical statistics in clinical researches*]. Moscow: GEOTAR-Media, 2006. 304 p. (in Russian)
  13. Zolin P.P., Konvai V.D., Domrachev A.A. [Fractionating of the purine compounds for energy metabolism study]. *Vestnik Omskogo Universiteta. [Herald of Omsk University]*. 2017; 22(1): 65-70. (in Russian)
  14. Gubler E.V., Genkin A.A. [*Application of the non-parametric statistical tests for medical-biological investigations*]. Leningrad: Meditsina, 1973. 143 p. (in Russian)
  15. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*. Ed. by J.C. Lindon, G.E. Tranter, D.W. Koppenaal. 3rd ed. Amsterdam: Academic Press, 2017. 3584 p.
  16. Khvatova E.M., Sidorkina A.N., Mironova G.V. [*Brain nucleotides: metabolism and evaluation during hypoxia*]. Moscow: Meditsina, 1987. 208 p. (in Russian)
  17. Henderson J.F., Paterson A.R.P. *Nucleotide metabolism: an introduction*. Burlington: Elsevier Science, 2014. 304 p.
  18. zur Nedden S., Doney A.S., Frenguelli B.G. Modulation of intracellular ATP determines adenosine release and functional outcome in response to metabolic stress in rat hippocampal slices and cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 2014; 128(1): 111-124. DOI: 10.1111/jnc.12397
  19. Galinsky R., Davidson J.O., Dean J.M., Green C.R., Bennet L., Gunn A.J. Glia and hemichannels: key mediators of perinatal encephalopathy. *Neural Regen. Res.* 2018; 13(2): 181-189. DOI: 10.4103/1673-5374.226378
  20. Liu R.Z., Fan C.X., Zhang Z.L., Zhao X., Sun Y., Liu H.H., Nie Z.X., Pu X.P. Effects of DI-3-n-butylphthalide on cerebral ischemia infarction in rat model by mass spectrometry imaging. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(11): 2451. DOI: 10.3390/ijms18112451.

### **Сведения об авторах:**

**Золин Петр Петрович** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры биохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0003-1900-7117>

**Конвай Владимир Дмитриевич** — доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; профессор кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы продуктов животноводства и гигиены сельскохозяйственных животных Института ветеринарной медицины и биотехнологий Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»