

УДК 661.12:658.562:615.07

В.Е. Доброва<sup>1</sup>, Е.В. Должикова<sup>1</sup>, Е.С. Колесник<sup>2</sup>, Е.А. Степанова<sup>1</sup><sup>1</sup>Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина<sup>2</sup>Национальный аэрокосмический университет «ХАИ», Харьков, Украина

## ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ДЕСТАБИЛИЗИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ НА МОДЕЛИ КОСТНОГО МОЗГА КРЫС

В данной работе проведено анализ особенностей новой, разработанной в Проблемной лаборатории морфофункциональных исследований Национального фармацевтического университета, методики изучения влияния дестабилизирующих факторов на модели костного мозга крыс. Для выявления источников неопределенности и оценки их влияния на конечный результат измерений построена диаграмма Ишикавы. С учетом этого выбраны и обоснованы приемлемые для оценки показатели, а также количественные характеристики. Приведены применяемые при валидации тесты и результаты полученных экспериментальных оценок.

**Ключевые слова:** валидация, методика «in vitro», неопределенность измерений, диаграмма Ишикавы, показатели воспроизводимости и повторяемости.

### Введение

На сегодняшний день в медико-биологических исследованиях влияния различных дестабилизирующих факторов (химических, механических, физических) все более популярными и востребованными становятся альтернативные методы исследования на клеточных культурах в условиях «in vitro». Проведение таких биотестов способствует расширению понимания различных физиологических явлений, связанных с действием факторов и дает возможность определить фармакологические и токсикологические действия веществ путем расшифровки молекулярных и клеточных механизмов [8 – 10].

Учитывая актуальность этого направления, в Проблемной лаборатории морфофункциональных исследований Национального фармацевтического университета (ПЛМИ НФаУ) была разработана методика определения влияния дестабилизирующих факторов на модели клеток костного мозга крыс в условиях «in vitro» [5]. Данная методика позволяет на клеточном уровне проанализировать силу и характер действия факторов внешнего воздействия любой природы происхождения (химического, физического и механического), а также определить направленность действия (цитотоксическое/ цитопротекторное) [4, 6].

При разработке и внедрении в лаборатории новой методики, в соответствии с требованиями стандарта ГОСТУ ISO/IEC 17025, международными документами «Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation» и рекомендациями Государственной фармакопеи Украины, необходимо провести полную валидацию новой методики [1, 7, 11].

В настоящее время значимой проблемой при проведении валидации биоаналитических методик

является отсутствие методических рекомендаций по выбору необходимых для оценки параметров и методик проведения этих процедур [1 – 3].

Кроме того, использование стандартных образцов, которое является базовым элементом при проведении валидации химико-аналитических методик, зачастую невозможно при оценке биологических образцов.

**Цель работы.** Провести полную валидацию новой, разработанной на базе ПЛМИ НФаУ методики определения влияния дестабилизирующих факторов на модели костного мозга крыс в условиях «in vitro».

Для достижения цели работы были поставлены такие задачи:

- 1) проанализировать особенности данной биоаналитической методики;
- 2) определить ключевые источники возникновения неопределенностей;
- 3) выбрать методы их оценки и количественные характеристики.

### Результаты и их обсуждение

Исследования проводились в условиях «in vitro» при температуре окружающей среды  $t=20^{\circ}\text{C}$ . Объект исследования, культуру клеток костного мозга, получали путем вымывания трубчатых костей нелинейных крыс-самок физиологическим раствором. Суспензию клеток окрашивали трипановым синим и помещали в камеру Горяева. Подсчет живых и мертвых клеток в каждой из ячеек камеры Горяева проводили с помощью микроскопа для клинической и лабораторной диагностики МИКМЕД-2. Время определения жизнеспособности клеток костного мозга в пробах варьировалось от 30 до 90 минут.

Оценку полученных результатов осуществляли следующим образом. Для серии измерений определяли среднюю долю мертвых клеток по формуле:

$$\bar{p} = \frac{\sum_{i=1}^j m_i}{\sum_{i=1}^j n_i}, \quad (1)$$

где  $m_i$  – количество мертвых клеток в  $i$ -ой серии;  $n_i$  – общее количество клеток в  $i$ -ой серии.

Определяли стандартную ошибку доли для серии  $n$  измерений:

$$\delta_{\bar{p}} = \frac{\delta_j}{\sqrt{\sum_{i=1}^j n_i}}, \quad (2)$$

где стандартное отклонение совокупности для одноразового измерения для серии  $j$  измерений определялось по формуле  $\delta_j = \sqrt{p(1-p)}$ .

Анализ возможных причин потери точности был проведен с помощью диаграммы Ишикавы (рис. 1). Установлено, что подсчет мертвых и живых клеток проходит в одной и той же пробе одновременно, с помощью одного и того же микроскопа.

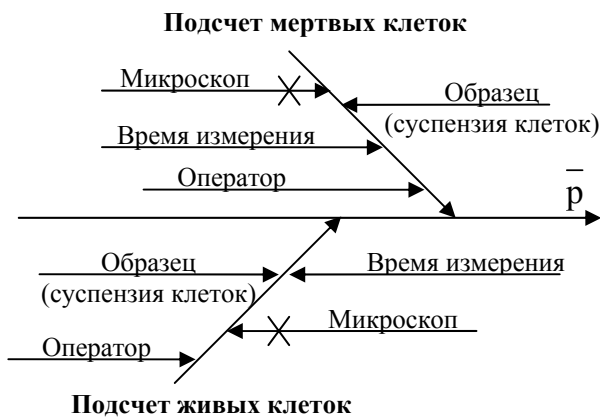


Рис. 1. Диаграмма Ишикавы для определения ключевых источников неопределенностей измерения анализируемой методики

Особенностью данной методики является то, что образец (суспензия клеток) готовится оператором-лаборантом по определенной СОП при каждом проведении опыта. При этом не предусматривается использование стандартного образца. Поэтому, необходимо определить на сколько на точность данной методики влияет фактор «образец».

Основным источником потери точности метода является оператор-лаборант, выполняющий данную методику. От его навыков, остроты зрения и степени усталости зависит точность подсчета клеток и вносимые при этом погрешности. Фактор «оператор»

так же включен в анализ этой методики.

Важным фактором, влияющим на точность, является время определения жизнеспособности клеток костного мозга в пробах. В силу того, что данная методика применяется для определения показателя токсичности вещества [4, 6], время измерения количества мертвых и живых клеток может составлять 15, 30, 60, 90 минут от начала эксперимента (например, от начала воздействия исследуемого химического вещества). Поэтому, для данной методики будет оцениваться влияние фактора «время измерения» на показатели точности.

Данную методику можно представить с помощью следующей статистической модели

$$Pr_t = \bar{p}_t + \delta_t + e_t, \quad (3)$$

где  $\bar{p}_t$  – общее среднее для заданного времени измерения ( $t = 30, 60, 90$  мин.);  $\delta_t$  – внутрилабораторная составляющая систематического сдвига метода, определяемая фактором «оператор»;  $e_t$  – случайная погрешность внутри серии образцов, определяемая отличием лабораторных животных, из которых извлекается культура клеток.

Для оценки точности данной методики был проведен расчет показателей повторяемости ( $S^2_t$ ) и воспроизводимости ( $S^2_R$ ).

Оценке дисперсий, характеризующих повторяемость и воспроизводимость, предшествовал предварительный анализ данных по критерию Кохрена

$$C_t = \frac{S^2_{t_{max}}}{\sum_{i=1}^6 S^2_{ti}}, \quad (4)$$

где  $S^2_{t_{max}} = \max\{S^2_{t1}, \dots, S^2_{t6}\}$ .

При  $N = 10$ ,  $M = 6$  и  $z = 0,95$  критическое значение критерия Кохрена  $C_{кр} = 0,3568$ . Расчетные значения этого критерия для заданного времени измерения ( $t = 30, 60, 90$  мин.) представлены в табл. 1.

Таблица 1

Проверка результатов на наличие грубых ошибок

Рассчитанное значение критерия Кохрена ( $C_t$ )			$C_{кр}$
Время измерения, мин.			
30	60	90	0,357
0,203	0,184	0,189	

Все эти значения (табл. 1) меньше  $C_{кр}$ , поэтому можно сделать вывод об однородности дисперсий и отсутствии грубых ошибок у оператора при проведении измерений и статистически значимых отличий между исследуемыми образцами.

Показатель повторяемости ( $S_r^2$ ) характеризует точность оценивания серии образцов ( $N = 10$ ) при заданном времени измерения ( $t = 30, 60, 90$  мин.) и определяется по формуле

$$S_{rt}^2 = \frac{\sum_{i=1}^6 S_{it}^2}{6}, \quad (5)$$

где  $S_{it}^2$  –  $i$ -ая дисперсия серии образцов при заданном времени измерения ( $t = 30, 60, 90$  мин.);  $M = 6$  – количество повторных экспериментов, проводимых одним и тем же оператором в разные дни.

Дисперсия воспроизводимости вычислялась по формуле

$$S_{Rt}^2 = \frac{5}{6} S_{rt}^2 + S_{jt}^2, \quad (6)$$

где  $S_{jt}^2 = \frac{1}{5} \sum_{i=1}^6 (\bar{p}_{it} - \bar{p}_t)^2$ ;  $\bar{p}_{it}$  – средняя доля мертвых клеток (1) при заданном времени измерения ( $t = 30, 60, 90$  мин.);  $\bar{p}_t = \frac{1}{6} \sum_{i=1}^6 \bar{p}_{it}$  – общая средняя доля мертвых клеток.

В табл. 2 представлены рассчитанные по результатам экспериментов оценки дисперсий воспроизводимости и повторяемости данной методики, а также вычисленные пределы повторяемости ( $r = 2,8 \cdot S_r$ ) и воспроизводимости ( $R = 2,8 \cdot S_R$ ).

Таблица 2

Определение СКО повторяемости и воспроизводимости ( $n = 10$ )

J	Время измерения, мин.					
	30		60		90	
	$\bar{p}$	$\delta_{\bar{p}}$	$\bar{p}$	$\delta_{\bar{p}}$	$\bar{p}$	$\delta_{\bar{p}}$
1	0,06	0,0036	0,09	0,0049	0,11	0,0053
2	0,07	0,0032	0,13	0,0049	0,15	0,0058
3	0,05	0,003	0,10	0,0046	0,12	0,0051
4	0,06	0,0035	0,10	0,0049	0,12	0,0052
5	0,06	0,0038	0,10	0,0052	0,12	0,0054
6	0,06	0,0035	0,10	0,0052	0,12	0,0058
$\bar{p}$	0,06	–	0,10	–	0,125	–
$S_r^2$	–	$1,1 \cdot 10^{-5}$	–	$2,4 \cdot 10^{-5}$	–	$2,9 \cdot 10^{-5}$
$S_j^2$	–	$1,7 \cdot 10^{-5}$	–	$1,3 \cdot 10^{-4}$	–	$2,2 \cdot 10^{-4}$
$S_R^2$	–	$2,8 \cdot 10^{-5}$	–	$1,5 \cdot 10^{-4}$	–	$2,5 \cdot 10^{-4}$
$S_R$	–	0,0053	–	0,0123	–	0,0156
r	–	0,0096	–	0,0139	–	0,0152
R	–	0,0148	–	0,0346	–	0,0438
U	–	0,014	–	0,032	–	0,04

Для оценки влияния фактора «время измерения» был проведен анализ дисперсий  $S_{rt}^2$  (табл. 2) по критерию Кохрена, который показал, что расчетное значение  $C = 0,584$  меньше  $C_{кр}(N = 10; M = 3; p = 0,95) = 0,6025$ .

Следовательно, влияние фактора «время измерения» статистически не значимо, и можно считать, что точность данной методики не зависит от этого параметра.

При оценке влияния фактора «время измерения» необходимо учитывать, что в данной методике не предусмотрено использование термостата или других стабилизирующих жизнедеятельность клеток устройств. Это приводит к естественным процессам гибели клеток, которые активизируются с увеличением времени от начала эксперимента. Поэтому определение межгрупповой дисперсии и общего группового среднего, где в данном случае группа определяется фактором «время измерения», не является корректным.

Проверка линейности разработанной методики проводилась в зависимости от изменения времени измерений. Для этого было сделано 3 серии измерений для времени 30, 60 и 90 минут. В каждой серии проведено десять повторных измерений.

Оценка линейности методики показала, что по заданному критерию приемлемости ( $R^2 = 0,9932$ ) линейная характеристика обеспечивает адекватную аппроксимацию зависимости измеряемой величины от времени проведения измерений.

Рассчитаны параметры линейной зависимости  $Y = 0,0267 + 0,0012 \cdot X$  и построен градуировочный график (рис. 2).

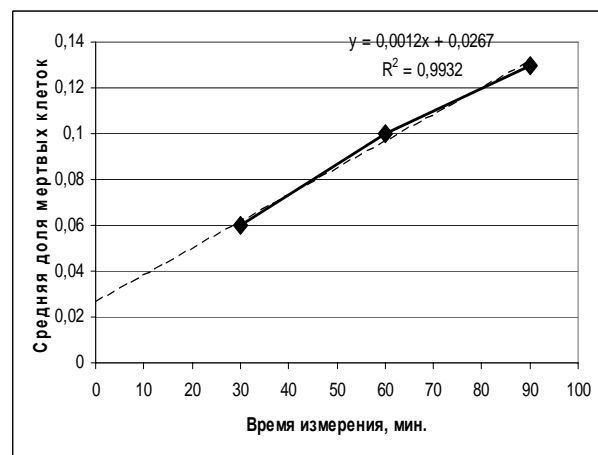


Рис. 2. График зависимости доли мертвых клеток от времени измерения

Учитывая особенности данной методики, была рассчитана расширенная неопределенность измерений  $U = t_S(p, v_{эф.}) \cdot u_c(y_j)$ .

Результаты расчета представлены в табл. 2.

## Выводы

Проведен анализ особенностей данной методики и в качестве ключевых источников возникновения неопределенностей определены факторы «оператор», «образец» и «время измерения».

Выполнена полная валидация новой, разработанной на базе ПЛМИ НФаУ методики определения влияния дестабилизирующих факторов на модели костного мозга крыс в условиях «in vitro», определены ее рабочие характеристики и рассчитаны неопределенности измерений при заданном времени измерения ( $t = 30, 60, 90$  мин.).

## Список литературы

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РЕПІГ, 2001. – 556 с.
2. Доброва В.Е. Анализ проблем валидации биоаналитических методик, используемых при фармакологических и клинических исследованиях лекарственных средств / В.Е. Доброва, Е.В. Должикова, Л.Н. Малоштан // Системы обработки информации: сб. науч. пр. – Х.: ХУ ПС, 2008. – Вып. 6 (64). – С. 29-31.
3. Доброва В.Е. Валидация методики определения глюкозы в пробах биологической жидкости глюкооксидным методом с помощью анализатора-фотометра биохимического ВРС Biosed / В.Е. Доброва, Е.В. Должикова, Л.Н. Малоштан // Системы обработки информации: сб. науч. пр. – Х.: ХУ ПС, 2008. – Вып. 4 (41). – С. 92-95.
4. Влияние широкополосного сигнала электромагнитного излучения миллиметрового диапазона низкой интенсивности на клетки костного мозга крыс / В.Е. Доброва, Е.В. Должикова, Л.М. Малоштан, Е.А. Степанова // XVI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: тезисы докл. – М., 2009. – С. 650.
5. Разработка альтернативной методики изучения влияния дестабилизирующих факторов на биологические объекты на модели in vitro / В.Е. Доброва,

Е.В. Должикова, Л.М. Малоштан, Е.А. Степанова // Фармация Казахстана : интеграция науки, образования и производства : междунар. науч.-практ. конф., 15-16 мая 2009 г.: тезисы докл. – К., 2009. – С. 45-49.

6. Influence of a broadband signal of millimeter range low density electromagnetic radiation over the bone marrow cells of rats / V. Dobrova, El. Dolzykova, L. Maloshtan, Ek. Stepanova // EUROCON 2009, May 18 – 23. Proceedings. Vol.4 – St-Petersburg, 2009. – P. 2058-2064.

7. ДСТУ ISO/IEC 17025:2006. Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій.

8. Коваленко В.Н. Альтернативные методы в доклиническом изучении токсичности лекарственных средств [Электронный ресурс] / В.Н. Коваленко // Сучасні проблеми токсикології (Соврем. пробл. токсикол.) – 2002. – № 4. – Режим доступу до журналу: [http://www.medved.kiev.ua/arhiv\\_mg/st\\_2002/02\\_4\\_3.htm](http://www.medved.kiev.ua/arhiv_mg/st_2002/02_4_3.htm).

9. Проницаемость мембран эритроцитов у больных с инфекционной патологией / О.И. Кулапина, В.Ф. Киричук, И.А. Утц, Е.Г. Кулапина, И.А. Зайцева // Критические технологии. Мембраны – 2005. – № 1 (25). – С. 3-11.

10. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности / В.С. Черепович, Е.В. Волочник, Е.В. Антоненко, Е.С. Лоткова, Т.В. Романовская, В.В. Гринев // Медицинский журнал – 2006. – № 2(16) – Режим доступа к журн.: <http://itlab.anitex.by/msmi/bmm/02.2006/44.html>.

11. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation // Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services, Rockvill, Maryland, May 2001.

Поступила в редколлегию 7.07.2009

Рецензент: д-р техн. наук, проф. Ю.П. Мачехин, Харьковский национальный университет радиоэлектроники, Харьков.

## ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ДЕСТАБІЛІЗУЮЧИХ ФАКТОРІВ НА МОДЕЛІ КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ

В.Е. Доброва, О.В. Должикова, Е.С. Колісник, К.О. Степанова

Проведено аналіз особливостей нової методики, яка розроблена у Проблемній лабораторії морфофункціональних досліджень Національного фармацевтичного університету. Для визначення джерел невизначеності та оцінки їх впливу на кінцевий результат була побудована діаграма Ішікави. Враховуючи це, обрані та обґрунтовані прийнятні для оцінки показники і кількісні характеристики. Наведено тести, що використовувалися при валідації, та результати отриманих експериментальних оцінок.

**Ключові слова:** валідація, методика «in vitro», невизначеність вимірювань, діаграма Ішікави, показники відтворюваності та збіжності.

## VALIDATION OF THE METHOD OF THE DESTABILIZING FACTORS INFLUENCE STUDYING BY THE MODEL OF BONE MARROW CELLS OF RATS

V.E. Dobrova, El.V. Dolzykova, E.S. Kolesnik, Ek.O. Stepanova

In this paper the analysis of features of a new method which is developed in the Problem laboratory of morphofunctional researches of the National university of pharmacy is conducted. To identify the sources of uncertainty and assess their impact on the final result of measurements Ishikawa Diagram was built. Taking this into account the estimation indexes and quantitative characteristics have been selected. The validation tests and the results of experimental evaluations was shown.

**Keywords:** validation, method «in vitro», measurement uncertainty, Ishikawa Diagram, indicators of reproducibility and repeatability.