

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ДЕСТАБІЛІЗУЮЧИХ ЧИННИКІВ НА МОДЕЛІ КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ

В.Є.Доброва, І.А.Зупанець, Л.М.Малоштан, К.О.Степанова

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: валідація; методика *in vitro*; невизначеність вимірювань; діаграма Ішикави; показники відтворюваності та збіжності

*Проведено аналіз особливостей методики визначення впливу дестабілізуючих чинників на моделі клітин кісткового мозку щурів в умовах *in vitro*, яка розроблена у Проблемній лабораторії морфофункціональних досліджень Національного фармацевтичного університету. Розроблено процедури проведення валідації цієї методики, які базуються на сучасних вимогах стандарту ДСТУ ISO / IEC 17025, міжнародних документах "Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation" та рекомендаціях Державної фармакопеї України. Для визначення джерел невизначеності та оцінки їх впливу на кінцевий результат була побудована діаграма Ішикави. Враховуючи це, ми обрали та обґрунтували показники і кількісні характеристики, прийнятні для оцінки цієї методики. Наведено тести, що використовувалися при валідації, та результати отриманих експериментальних оцінок. Визначені робочі характеристики методики та розраховані невизначеності вимірювань при заданому часі.*

На теперішній час при дослідженні впливу різних дестабілізуючих факторів (хімічних, механічних, фізичних) все більш популярними і затребуваними стають альтернативні методи дослідження на клітинних культурах *in vitro*. Проведення таких біо-тестів сприяє розширенню розуміння різних фізіологічних явищ, пов'язаних з дією факторів, і дає можливість визначити фармакологічні та токсикологічні дії речовин шляхом розшифровки молекулярних і клітинних механізмів [8-10].

Враховуючи актуальність цього напрямку, в Проблемній лабораторії морфофункціональних досліджень Національного фармацевтичного університету (ПЛМД НФаУ) була розроблена методика визначення впливу дестабілізуючих чинників на моделі клітин кісткового мозку щурів *in vitro* [5]. Ця методика дозволяє на клітинному рівні проаналізувати силу і характер дії факторів

зовнішнього впливу будь-якого походження (хімічного, фізичного і механічного), а також визначити спрямованість дії (цитотоксичну/цитопротекторну) [6, 11].

При розробці і впровадженні в лабораторії нової методики відповідно до вимог стандарту ДСТУ ISO / IEC 17025 слід користуватися міжнародними документами "Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation" та рекомендаціями Державної фармакопеї України та провести повну валідацію нової методики [1, 7, 12].

На сьогоднішній день в Україні розвиток нормативної бази, що стосується валідації біоаналітичних методик, тільки розпочався, тоді як у США валідація біоаналітичних методів є обов'язковою умовою використання їх у лабораторіях і регламентується "Правилами" [12]. При проведенні валідації біоаналітичних методик важливо зробити правильний вибір необхідних параметрів і ме-

тодик для їх оцінки. Крім того, використання стандартних зразків, що є базовим елементом при проведенні валідації хіміко-аналітичних методик, найчастіше неможливо при оцінці біологічних зразків [1-4].

Метою роботи було проведення повної валідації нової методики, розробленої на базі ПЛМД НФаУ, для визначення впливу дестабілізуючих чинників на моделі клітин кісткового мозку щурів в умовах *in vitro*.

Матеріали та методи

Дослідження проводились в умовах *in vitro* при температурі зовнішнього середовища $t = 20^{\circ}\text{C}$. Об'єкт дослідження — культуру клітин кісткового мозку отримували шляхом вимивання трубчастих кісток нелінійних щурів-самок фізіологічним розчином. У суспензію клітин додавали трипановий синій. Підрахунок живих і мертвих клітин проводили у камері Горяєва за допомогою мікроскопу для клінічної і лабораторної діагностики МІКМЕД-2. Час

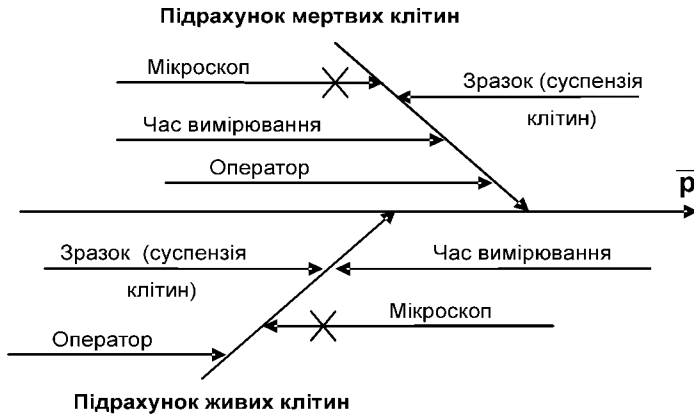


Рис. 1. Діаграма Ішкови для визначення ключових джерел невизначеностей вимірювань методики, що аналізується

визначення життєздатності клітин кісткового мозку в пробах варіювався від 30 до 90 хв.

Результати та їх обговорення

Для досягнення мети дослідження були поставлені наступні завдання:

- 1) проаналізувати особливості даної біоаналітичної методики;
- 2) визначити ключові джерела виникнення невизначеностей;
- 3) обрати методи їх оцінки та кількісні характеристики.

Проведення валідації цієї біоаналітичної методики проводилося на базі запропонованих методичних підходів та розробленого валідаційного майстер-плану [4].

Оцінку отриманих результатів здійснювали наступним чином. Для серії вимірювань визначали середню частку мертвих клітин за формулою:

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

де: m_i — кількість мертвих клітин в i -тій серії;

n_i — загальна кількість клітин в i -тій серії.

Визначали стандартну помилку частки для серії n вимірювань:

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

де стандартне відхилення сукупності для разового вимірювання

для серії j вимірювань визначалося за формулою $\delta_j = \sqrt{\bar{p}(1-\bar{p})}$.

Аналіз можливих причин втрати точності був проведений за допомогою діаграми Ішкови (рис. 1). Встановлено, що підрахунок мертвих і живих клітин проводиться в одній і тій же пробі одночасно, за допомогою одного і того ж мікроскопу.

Особливістю даної методики є те, що зразок (суспензія клітин) готується оператором-лаборантом за певною "Стандартною операційною процедурою" при кожному проведенні дослідження. При цьому не передбачається використання стандартного зразка. Тому необхідно визначити, якою мірою на точність даної методики впливає чинник "зразок".

Основну відповідальність за втрату точності методу несе оператор-лаборант, який готує суспензію клітин. Від його навичок, гостроти зору та втомлюваності залежить точність підрахунку клітин і похибка, що вноситься при цьому. Тому чинник "оператор" так само включений в аналіз методики.

Важливим чинником, що впливає на точність, є час визначення життєздатності клітин кісткового мозку в пробах. Внаслідок того, що ця методика застосовується для визначення показника токсичності речовини [4, 6], час вимірювання кількості мертвих і живих клітин може складати 15, 30, 60, 90 хв від початку експерименту (наприклад, від початку дії досліджуваної хімічної речовини). Тому для даної методики оцінюється також вплив чинника "час

вимірювання" на показники точності.

Таку методику можна представити за допомогою наступної статистичної моделі

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

де: \bar{p}_t — загальне середнє для заданого часу вимірювання ($t = 30, 60, 90$ хв);

δ_t — внутрішньолaboratorна складова систематичного зсуву методу, що визначається фактором "оператор";

e_t — випадкова похибка у середині серії зразків, що визначається відмінністю лабораторних тварин, з яких отримують культуру клітин.

Для оцінки точності даної методики був проведений розрахунок показників повторюваності (S^2_r) і відтворюваності (S^2_R).

Перед оцінкою дисперсій, що характеризують повторюваність і відтворюваність, проводили попередній аналіз даних за критерієм Кохрена.

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

де $S_{t\max}^2 = \max\{S_{t1}^2, \dots, S_{t6}^2\}$.

При $N = 10$, $M = 6$ і $p = 0,95$ критичне значення критерію Кохрена $C_{кр} = 0,3568$. Отримані значення цього критерію для заданого часу вимірювання ($t = 30, 60, 90$ хв) наведені в табл. 1.

Оскільки всі ці значення (табл. 1) менше $C_{кр}$, можна зробити висновки про однорідність дисперсій і відсутність грубих помилок у оператора при проведенні вимірів, а також статистично значимих відмінностей між досліджуваними зразками. Показник повторюваності (S^2_r) характеризує точність оцінювання серії зразків ($N = 10$) при заданому часі вимірювання ($t = 30, 60, 90$ хв) та визначається за формулою

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

де: S_{ti}^2 — i -та дисперсія серії зразків при заданому часі вимірювань ($t = 30, 60, 90$ хв);

Таблиця 1

Перевірка результатів на існування грубих помилок

Розраховане значення критерію Кохрена (C_t)			$C_{кр}$
Час вимірювання, хв			
30	60	90	0,357
0,203	0,184	0,189	

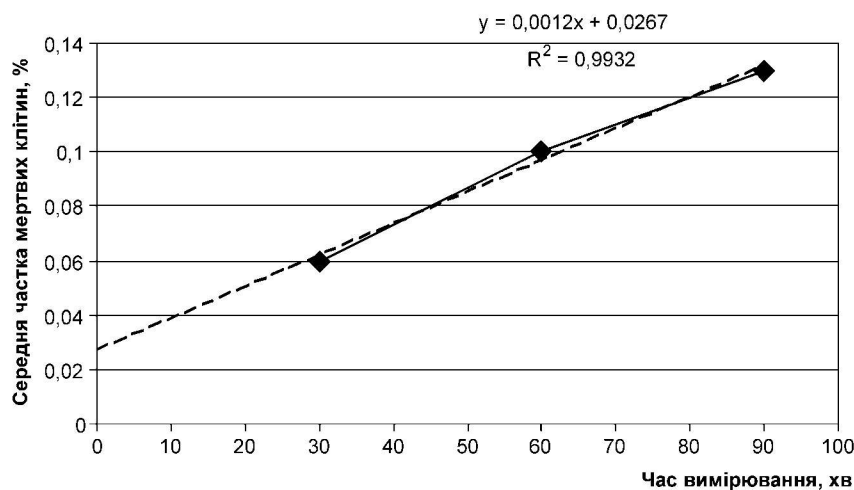


Рис. 2. Графік залежності частки мертвих клітин від часу вимірювання

$M = 6$ — кількість повторних експериментів, що проводяться одним і тим же оператором у різні дні.

Дисперсію відтворюваності обчислювали за формулою:

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

$$\text{де: } S_{jt}^2 = \frac{1}{5} \sum_{i=1}^6 (\bar{p}_{it} - \bar{\bar{p}}_t)^2;$$

Таблиця 2

Бюджет невизначеності та оцінка повторюваності і відтворюваності ($n = 10$)

J	Час вимірювання, хв					
	30		60		90	
	\bar{p}	σ_p	\bar{p}	σ_p	\bar{p}	σ_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
$\bar{\bar{p}}_t$	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

\bar{p}_{it} — середня частка мертвих клітин (1) при заданому часі вимірювання ($t = 30, 60, 90$ хв);

$$\bar{\bar{p}}_t = \frac{1}{6} \sum_{i=1}^6 \bar{p}_{it} \quad \text{— загальна середня}$$

частка мертвих клітин.

У табл. 2 представлені розраховані за результатами експериментів оцінки дисперсій відтворюваності і повторюваності даної методики, а також обчислені межі повторюваності ($r = 2,8 \cdot S_r$) та відтворюваності ($R = 2,8 \cdot S_R$).

Для оцінки впливу чинника “час вимірювання” був проведений аналіз дисперсій S_{rt}^2 (табл. 2) за критерієм Кохрена, який показав, що розраховане значення $C = 0,584$ менше за $C_{кр}$ ($N = 10$; $M = 3$; $p = 0,95$) $= 0,6025$. Отже, вплив чинника “час вимірювання” статистично не має значення, тому можна вважати, що точність даної методики не залежить від цього параметра.

При оцінюванні впливу чинника “час вимірювання” необхідно враховувати, що за даною методикою не передбачено використання термостату або інших пристроїв, що стабілізують життєдіяльність клітин. Це призводить до природних процесів їх загибелі, які активізуються із зростанням часу від початку експерименту, у зв'язку з порушенням бар'єрних і структурних властивостей ліпідного шару — причин розвитку ряду патологічних станів. Дослідники виділяють чотири основні чинники, що безпосередньо викликають порушення бар'єрних властивостей мембран у патології: перекисне окиснення ліпідів, активація ендогенних фосфоліпаз, механічне (осмотичне) розтягування мембран, адсорбція на ліпідному шарі поліелектролітів, включаючи поліпептиди і білки.

Тому визначення міжгрупової дисперсії та загального групового середнього, де в даному випадку група визначається чинником “час вимірювання”, не є коректним.

Перевірка лінійності розробленої методики проводилася залежно від зміни часу вимірювання. Для цього було оброблено 3 серії вимірювань для часу 30, 60 і 90

хвилин. У кожній серії проведено десять повторних вимірювань.

Оцінка лінійності методики показала, що за заданим критерієм прийнятності ($R^2 = 0,9932$) лінійна характеристика забезпечує адекватну апроксимацію залежності вимірюваної величини від часу проведення вимірювань.

Розраховані параметри лінійної залежності $Y = 0,0267 + 0,0012 \cdot X$ та побудований градувальний графік (рис. 2).

Враховуючи особливості даної методики, була розрахована розширена невизначеність вимірювань $U = ts(p, v_{\text{эф.}} \cdot u_c(y))$. Результати розрахунку наведені в табл. 2.

ВИСНОВКИ

1. Проведено аналіз особливостей розробленої методики з оцінки цитотоксичного/цитопротекторного впливу та визначені ключові джерела виникнення невизначеностей.

2. Зроблено оцінку впливу чинників “оператор”, “зразок” та “час

вимірювання” на точність даної методики.

3. Виконана повна валідація нової методики визначення впливу дестабілізуючих чинників на моделі кісткового мозку щурів в умовах “*in vitro*”, розробленої на базі ПЛМД НФаУ.

4. Визначені робочі характеристики методики та розраховані невизначеності вимірів при заданому часі вимірювань ($t = 30, 60, 90$ хв).

ЛІТЕРАТУРА

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. — 1-е вид. — Х.: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
2. Добрава В.Е., Должикова Е.В., Малоштан Л.Н. // Системи обробки інформації. — 2008. — Вип. 6 (64). — С. 29-31.
3. Добрава В.Е., Должикова Е.В., Малоштан Л.Н. // Системи обробки інформації. — 2008. — Вип. 4 (41). — С. 92-95.
4. Добрава В.Е., Коваленко С.М., Малоштан Л.М., Степанова К.О. // Управління, економіка та забезпечення якості у фармації. — 2009. — Вип. 4 (6). — С. 9-13.
5. Добрава В.Е., Должикова Е.В., Малоштан Л.Н., Степанова Е.А. // Фармация Казахстана: интеграция науки, образования и производства: тезисы докл. междунар. науч.-практ. конф., 15-16 мая 2009 г. — К., 2009. — С. 45-49.
6. Добрава В.Е., Должикова О.В., Малоштан Л.М., Степанова К.О. // Фармац. часопис. — 2009. — Вип. 4 (9). — С. 94-97.
7. ДСТУ ISO/IEC 17025:2006 Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій (ISO/IEC 17025:2005, IDT). — К.: Держспоживстандарт України. — 18 с.
8. Коваленко В.Н. Альтернативные методы в доклиническом изучении токсичности лекарственных средств [Електронний ресурс] // Сучасні проблеми токсикології (Соврем. пробл. токсикол.) — 2002. — №4. — Режим електронного доступу до журналу: http://www.medved.kiev.ua/arhiv_mg/st_2002/02_4_3.htm
9. Кулапина О.И., Киричук В.Ф., Утц Н.А. и др. // Критические технол. Мембраны. — 2005. — № 1 (25). — С. 3-11.
10. Черепович В.С., Волочник Е.В., Антоненко Е.В. и др. // Медицинский журн. — 2006. — №2 (16). — Режим доступа к журн.: <http://tlab.anitex.by/msmi/bmm/02.2006/44.html>
11. Dobrova V., Dolzykova E., Maloshtan L., Stepanova E. // EUROCON 2009, May 18 — 23. Proceedings. Vol. 4 — St-Petersburg, 2009. — P. 2058-2064.
12. 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. — Режим електронного доступу до журналу: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Пушкінська, 53. Тел. (57) 706-30-71.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 08.12.2010 р.