

УДК 57.085.2

АНАЛИЗ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРАТКОВРЕМЕННОЙ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКА

В.А. Вокина,
Н.Л. Якимова,
Л.М. Соседова

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, г. Ангарск, Российская Федерация

Проведено исследование цитотоксичности 29-ти образцов мочи и 13 образцов почвы и снегового покрова с использованием кратковременной суспензионной культуры сперматозоидов быка на анализаторе токсичности АТ-05. Для каждого образца проведено 3-4 повторных серий испытаний с использованием новых опытных и контрольных растворов, а также вновь размороженной суспензии сперматозоидов. Для оценки воспроизводимости результатов измерений определяли коэффициент вариации индекса токсичности (It). Показано, что It является высоко вариабельным показателем. Повторные серии испытаний позволяют снизить вероятность ошибки при исследовании.

Ключевые слова: воспроизводимость, цитотоксичность, анализатор токсичности.

Введение. Анализатор токсичности АТ-05 является широко используемым экспресс-методом оценки токсичности различных материалов на суспензии сперматозоидов быка. Использование данного метода на практике позволяет оптимизировать токсикологические исследования на предварительном этапе. Метод используется при проведении санитарно-эпидемиологических экспертиз текстильных, медицинских и полимерных материалов, а также парфюмерно-косметической продукции, отходов производства и т.п. [1,2,3,4,5]. Кроме того, есть данные о его применении в аллергологической клинической практике, для скрининга токсичности биологических жидкостей [6,7,8]. Как и в любом приборе, эксплуатация АТ-05 сопровождается определенной точностью и воспроизводимостью измерений, которые обусловлены как параметрами прибора, так и особенностями работающих на нем операторов. При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с методикой для экспресс-оценки острой токсичности водных вытяжек из почв, отходов производства и потребления, а также сточных, поверхностных

и грунтовых вод [9] границы погрешности (относительной ($\pm\delta$) и приведенной к верхнему пределу диапазона измерений ($\pm\delta_{пр}$) составляют от 20 до 40 % в зависимости от вида исследуемого объекта. По протоколу исследований, предложенному разработчиками метода, дополнительные серии испытаний предусмотрены в случаях, если: 1) величина It находится за пределами рекомендуемого интервала значений, 2) коэффициент вариации средневзвешенного времени подвижности сперматозоидов для контрольной и опытной проб - $K_{вар} > 15\%$ (для проб текстильных материалов) [1], $K_{вар} > 0,25\%$ (для проб воздуха) [10], $K_{вар} > 7\%$ при $It \geq 50\%$ и $K_{вар} > 15\%$ при $It \leq 50\%$ (для проб почв, почвогрунтов, вод и отходов) [5,9]. Ошибка метода, количественно выражаемая показателями повторяемости и вариабельности, а также значения погрешности (и ее составляющих) при использовании АТ-05 для оценки цитотоксичности биологических жидкостей изучена пока недостаточно. Несомненно, при использовании стандартных подходов по оценке показателей валидации данного метода, воспроизводимость метода может быть оценена как низкая, так как в его основе лежит

Вокина Вера Александровна (Vokina Vera Alexandrovna), к.б.н., научный сотрудник ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, г. Ангарск, Российская Федерация, vokina.vera@gmail.com
Якимова Наталья Леонидовна (Yakimova Natalia Leonidovna), к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, г. Ангарск, Российская Федерация, ynl-77@list.ru
Соседова Лариса Михайловна (Sosedova Larisa Michailovna), д.б.н., профессор, заведующая лабораторией ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, г. Ангарск, Российская Федерация, tox_lab@mail.ru

анализ подвижности живого объекта – суспензии сперматозоидов, а не классический процесс химических или биохимических реакций, как в случае с аналитическими методами с применением стандартных образцов.

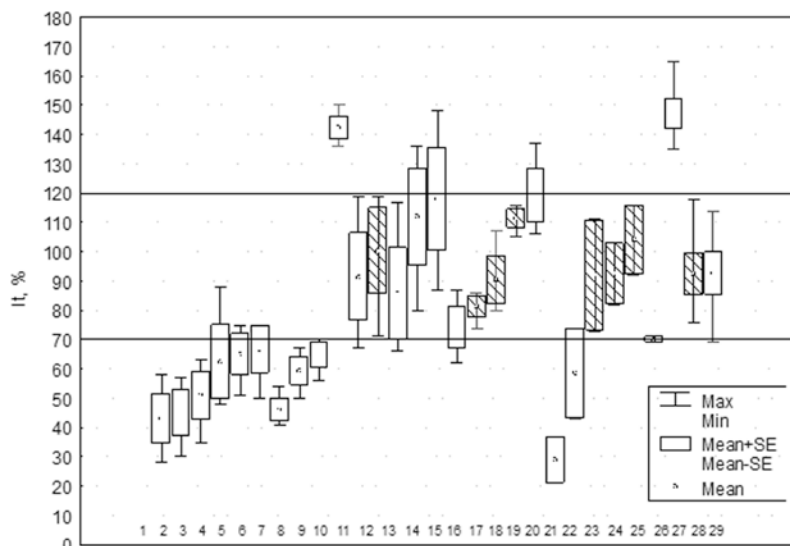
В связи с изложенным, целью настоящей работы явилась оценка воспроизводимости результатов измерений It образцов мочи, почвы и снегового покрова на приборе АТ-05, полученных в условиях воспроизводимости (один оператор, короткий временной интервал, идентичный материал).

Материалы и методы исследования. При проведении экспериментов по сходимости результатов при исследовании цитотоксичности с использованием кратковременной суспензионной культуры сперматозоидов быка исследовались образцы

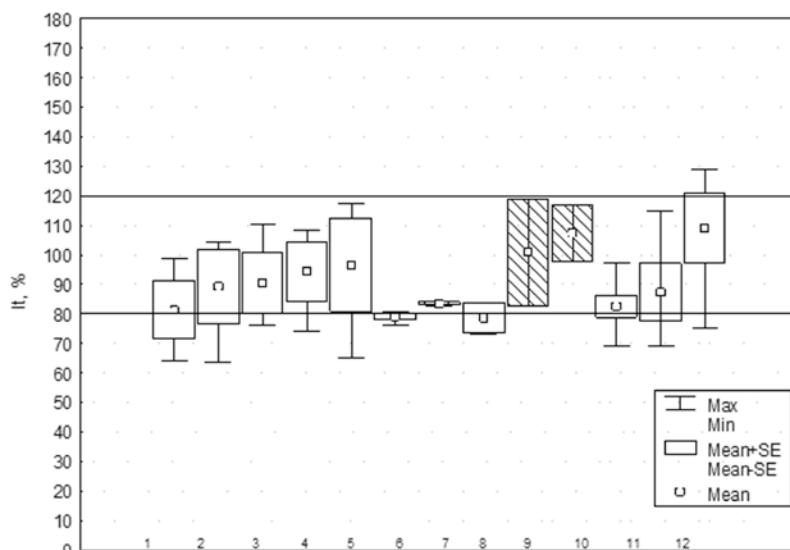
мочи детского населения (n=29), снегового покрова (n=6), а также образцы почвы (n=7). Пробоподготовку образцов почвы и снега проводили в соответствии с методическими рекомендациями [9], образцы мочи предварительно доводили до изотонии добавлением глюкозы и цитрата натрия, затем разводили глюкозо-цитратной средой 1:2 по методике, предложенной Еськовым А.П. и соавт. [7]. Оценку цитотоксичности исследуемых образцов проводили с использованием анализатора токсичности «АТ-05» по изменению двигательной активности сперматозоидов быка. Критериальным показателем цитотоксичности являлся (It). Согласно протоколу, предложенному разработчиками АТ-05, образец считали нетоксичным, если значение индекса токсичности находилось в пределах от 70 до 120 % для проб мочи, для образцов почвы и снега – от 80 до 120%.

Для оценки воспроизводимости результатов измерений проведено 3-4 повторных серий испытаний для каждого образца, в каждой из которых использовались разные серии опытных и контрольных растворов, а также вновь размороженная суспензия сперматозоидов. После получения результатов измерений It образцов почвы, снега и мочи была проведена статистическая обработка данных с вычислением среднего значения, стандартного отклонения и коэффициента вариации (отношение стандартного отклонения к среднему значению). Статистическая обработка выполнена с использованием ППП Statistica 6.0. (StatSoft) (лиц № АХХR004Е642326FA).

Результаты и обсуждение. По результатам первого тестирования было обнаружено 15 нетоксичных образцов мочи (из 29-ти), значения It которых находились в диапазоне $70\% \leq It \leq 120\%$. Все регламентирующие правила методики были выполнены, $K_{\text{вар}}$ средневзвешенного времени подвижности сперматозоидов для контрольной и опытной проб не превышал 15%, что позволяло прекратить дальнейшие исследования для данных проб. Однако при проведении повторных серий испытаний It значительно варьировал, переходя границы рекомендуемого интервала. Так, в пробе № 4 в первой серии испытаний It составил 88,2, что позволяет считать результат статистически значимым и отнести данную пробу к нетоксичным, однако при повторных испытаниях It снизился до 48,2 и 50,6% - что соответствовало токсичным образцам (рис. 1А). В целом при 3-4 повторных испытаниях было выявлено еще 7 токсичных проб мочи. Только у 8-ми образцов во всех сериях испытаний It



А



В

Рис. 1. Результаты последовательных измерений индекса токсичности образцов: А – моча; В – почва и снег. Штриховкой показаны нетоксичные пробы, линиями – интервал, при соответствии которому образец считается нетоксичным. По оси абсцисс указан номер образца.

находился в пределах допустимого интервала – 70-120%. При повторных исследованиях токсичных образцов результат подтвержден в 12 из 14 пробах.

Анализ результатов исследования образцов снега и почвы показал, что при соблюдении всех необходимых условий тестирования и протокола испытаний, при первом тестировании из 13 проб нетоксичными следовало считать 7 проб, токсичными - 6. Однако при повторных испытаниях дополнительно выявлено 4 токсичных пробы. Так, при трех последовательных испытаниях пробы №11 It составлял соответственно 89,5; 69,2 и 97,0% и не позволял однозначно трактовать полученный результат (рис. 1В).

Заключение. Анализ данных каждого образца показал, что коэффициент вариации It достигает

высоких значений, независимо от типа тестируемого образца - биологическая жидкость или снег и почва. В большинстве случаев It демонстрировал высокую вариабельность, что, по всей вероятности, может быть обусловлено качественными характеристиками сперматозоидов.

Таким образом, отнесение испытуемого образца к токсичному или нетоксичному в пределах однократного исследования следует проводить с осторожностью. Мы рекомендуем проводить повторные серии испытаний (3-4) для образцов, у которых первично It соответствовал нетоксичным образцам. Согласно протоколу, предложенному разработчиками, повторные исследования предусмотрены только при получении значений It, не соответствующего рекомендованному интервалу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ Р 32075-2013. Материалы текстильные. Метод определения токсичности. Москва: Стандартинформ, 2015.
2. ГОСТ Р 52770-2007. Изделия медицинские. Требования безопасности. Методы санитарно-химических и токсикологических испытаний. Москва: Стандартинформ, 2007.
3. МУ 1.1.037-95. Методические указания. Биотестирование продукции из полимерных и других материалов. Москва: Госкомсанэпиднадзор России, 1996.
4. МР 29ФЦ/394. Методические рекомендации. Экспресс-метод оценки общетоксического и кожно-раздражающего действия парфюмерно-косметической продукции in vitro (на культуре подвижных клеток). Москва: Минздрав России, 2001
5. МР 2.1.7.2279-07. Экспресс-оценка токсичности отходов производства и потребления на культуре клеток млекопитающих. Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.
6. Ежова О.А., Хлебникова Н.Н., Алчинова И.Б., Архипова Е.Н., Карганов М.Ю., Торшин В.И. Новые методы

- лабораторной диагностики и контроля эффективности терапии аллергических заболеваний. Вестник РУДН. Сер. Медицина. 2008; 3: 52-58.
7. Еськов А.П., Каюмов Р.И., Соколов А.Е., Ткачев В.К., Захаров В.Ю., Шашков Б.В. Скрининг токсичности биологических жидкостей. Клиническая лабораторная диагностика. 2002; 5: 45-47.
8. Еськов А.П., Каюмов Р.И., Ткачев В.К., Захаров В.Ю., Шашков Б.В. Оценка токсемии крови с использованием кратковременной суспензионной культуры подвижных клеток (спермы быка). Токсикологический вестник. 2000; 6: 10-12.

9. ФР.1.31.2009.06301. ПНД Ф 14.1:2:4:15-09; 16.1:2:3:3.13-09. Методика выполнения измерений индекса токсичности почв, почвогрунтов, вод и отходов по изменению подвижности половых клеток млекопитающих in vitro.
10. МР 29ФЦ/2688-2003. Методические рекомендации. Экспресс-метод оценки токсичности проб воздуха по водорастворимым компонентам с использованием в качестве тест-объекта спермы крупного рогатого скота. Москва: Минздрав России, 2003.

REFERENCES:

1. State Standard R 32075-2013. Textile materials. Method of determination of toxicity. Moscow: Standartinform Publ., 2015 (in Russian).
2. State Standard R 52770-2007. Medical devices. Safety requirements. Methods of sanitary-chemical and toxicological tests. Moscow: Standartinform Publ., 2007 (in Russian).
3. Methodical Guidelines 1.1.037-95. Methodical instructions. The bioassay production of polymeric and other materials. Moscow: Goskomsanepidnadzor Rossii, 1996 (in Russian).
4. Methodical Guidelines 2.1.7.2279-

07. An express assessment of toxicity of production wastes and consumption on culture of cages of mammals. Moscow: Federal'nyy tsentr gigeny i epidemiologii Rospotrebнадзора, 2008 (in Russian).
5. Methodical Guidelines 29FTs/394. Guidelines. Express-method of assessing general toxicity and skin-irritating perfumes and cosmetic products in vitro (in the culture of motile cells). Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation, 2001 (in Russian).
6. Ezhova O.A., Khlebnikova N.N., Alchinova I.B., Arkhipova E.N., Karganov M. Yu., Torshin V.I. New methods of laboratory

- diagnostics and control of efficiency of therapy of allergic diseases. Vestnik RUDN. Ser. Meditsina. 2008; 3: 52-58 (in Russian).
7. Es'kov A.P., Kayumov R.I., Sokolov A.E., Tkachev V.K., Zakharov V.Yu., Shashkov B.V. Screening of toxicity of biological liquids. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2002; 5: 45-47. (in Russian).
8. Es'kov A.P., Kayumov R.I., Tkachev V.K., Zakharov V.Yu., Shashkov B.V. Assessment of a blood toksemiya with use of short-term suspension culture of mobile cages (sperm of a bull). Toksikologicheskii vestnik. 2000; 6: 10-12. (in Russian).
9. FR.1.31.2009.06301. PND F 14.1:2:4:15-09; 16.1:2:3:3.13-09. Method of performance of measurements of an index of toxicity of soils, waters and waste on change of mobility of gametes of mammals of in vitro. Moscow: MGU, 2009 (in Russian).
10. Methodical Guidelines 29FTs/2688-2003. An express method of an assessment of toxicity of tests of air on water soluble components with use as test object of sperm of cattle. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation, 2003 (in Russian).

V.A. Vokina, N.L. Yakimova., L.M. Sosedova

ANALYSIS OF RESULTS REPRODUCIBILITY IN THE CYTOTOXICITY STUDIES PERFORMED WITH THE USE OF BULL SPERMATOZOA SHORT-TERM SUSPENSION CULTURE

East-Siberian Institute of Medical and Ecological Researches, 665827, Angarsk, Russian Federation

Cytotoxicity of urine (n=29), soil and snow (n=13) using bull spermatozoa short-term suspension culture and analyzer AT-5 was studied. For each sample, 3 to 4 repeated series of tests were carried out with new test and control solutions as well as with newly defrosted bull spermatozoa suspension. To assess reproducibility of results, a variation factor for the index of toxicity (It) was determined. It is shown that It is highly variable. Repeated series of tests allow to lower probability of error in the research.

Keywords: reproducibility, cytotoxicity, toxicity analyzer.

Переработанный материал поступил в редакцию 14.01.2016 г.