

УДК: 576:001.891.57.: 612.014.482:615.246.2

Малюк В. І., Стеченко Л. О., Куфтирева Т. П., Бідна Л. П.

## ВЕРИФІКАЦІЯ ЕКОЛОГІЧНОГО КЛІТИННОГО МАРКЕРА НИЗЬКИХ ДОЗ РАДІАЦІЇ

*Досліди поставлено на ювенільних щурах за 3-факторним планом. Тварини опромінювались  $^{60}\text{Co}$  у дозах 30 і 100 сГр й одержували сукцинат і цитрат натрію з молоком їхніх матерів. Мультифакторні ефекти на кількість недозрілих фолікулів у яєчниках досліджувалися через 1 і 5 днів після опромінення. Результати верифікації засвідчили, що запропонований маркер насправді відрізняється високою чутливістю до радіаційного опромінення та спроможний коректно й адекватно відображати загальну біологічну реакцію на радіацію, а також її модифікацію радіопротекторними метаболітами.*

### Вступ

Щоб обґрунтувати логіку, орієнтацію та структуру даної роботи, а також уникнути можливого термінологічного непорозуміння, означимо передусім зміст базисних понять — верифікації, potwierдження, адекватності — щодо дослідженого маркера (див. повідомлення у попередньому томі “Наукових записок НАУКМА”).

**Верифікація**, з позицій системного аналізу, — це оцінка успішності моделювання (в нашому випадку — екологічної індикації). В основу процедури верифікації покладено такі критерії:

- коректність відображення досліджуваної частини реальної системи поведінкою моделі;
- збіг механізмів моделі з відомими механізмами явищ, що відбуваються в реальній системі.

Однак те, що є коректним для якихось окремих складників моделі, може виявитися менш відповідним після їхнього об’єднання в єдине ціле. Відтак виникає необхідність перевірити послідовним факторним аналізом взаємні зв’язки між різними впливами на систему та її реакціями. Тільки задовольнивши цю неодмінну умову, можна твердити, що дослідження поведінки моделі (екологічного маркера) у світлі поставленої мети відтворює справді поведінку реальної системи.

**Потвердження** моделі — це кількісний вираз того, якою мірою вихід моделі (її реакція) узгоджується з поведінкою реальної системи. Ця процедура має на меті об’єктивну й точну перевірку вихідної гіпотези за допомогою статистичних процедур. Вони водночас сприяють з’ясуванню **адекватності** моделі — її відповідності реальній системі. Модель вважається за адекватну, якщо спостереження при всіх вимірюваних

навантаженнях у покладених межах погоджуються з передбаченням.

Процедуру potwierдження ускладнює непевність загального висновку через скінченне, як правило, невелике, число експериментів. Ця непевність набуває тим більшої ваги, чим ближчими є передбачувані ефекти до того порядку величин, що й випадкові флюктуації, притаманні всім вимірюванням у реальних системах (“шумотіння”). За таких обставин конче потрібно застосовувати методи математичного планування й аналізу дослідів.

Все ж щонайперший аспект potwierдження полягає в тім, щоб наперед, свідомо допустити можливість змін більш ніж одного параметра одночасно. Тому potwierдження системних моделей потребує мультифакторних експериментів для визначення змін досліджуваних чинників, які зумовлюють ефекти їхньої взаємодії [1].

### Матеріал і методи дослідження

Експерименти 3-факторного плану було проведено на 48 ювенільних самках щурів віком 6—7 днів (після народження). Самкам-годувальницям із питною водою впродовж 3 днів до опромінення їхніх нащадків — сисунців — вводили сукцинат та цитрат натрію (з розрахунку 1 ммоль/кг — верхній рівень дії факторів **B** та **C** і 0,2 ммоль/кг — нижній рівень дії тих самих факторів). Відповідно, сисунці одержували ті ж такі препарати з молоком матерів. На 4 добу після початку експерименту сисунків посліду відокремлювали від матерів, опромінювали одноразово зовні на гама-опромінювачі “Рокус” (джерело —  $^{60}\text{Co}$ ), після чого повертали назад до материнської клітки. Використовувались дози

Таблиця 1  
План і матриця 3-факторного дворівневого експерименту

| Номер варіанту досліджу | Опромінення Фактор А | Сукцинат натрію Фактор В | Цитрат натрію Фактор С |
|-------------------------|----------------------|--------------------------|------------------------|
| 1                       | -                    | -                        | -                      |
| 2                       | +                    | -                        | -                      |
| 3                       | -                    | +                        | -                      |
| 4                       | +                    | +                        | -                      |
| 5                       | -                    | -                        | +                      |
| 6                       | +                    | -                        | +                      |
| 7                       | -                    | +                        | +                      |
| 8                       | +                    | -                        | +                      |

Примітки: (-) — фактор взято на нижньому рівні дози;  
(+) — фактор взято на вищому рівні дози.

100 сГр (вищий рівень дії фактора А) та 30 сГр (нижчий рівень дії фактора А). Потужність дози — 0,89 Гр/хв., ВДШ — 75 см. Самки-матері не опромінювались. Опромінених сисунців забивали під рауш-наркозом через 1 і 5 діб після опромінення. В пострадіаційному періоді сисунці продовжували отримувати фармакологічні препарати з материнським молоком.

Техніка препарувальної обробки матеріалу не відрізнялася від застосованої у попередньому повідомленні.

Середня кількість примордіальних фолікулів у зрізах визначалась під оптичним мікроскопом на 50 серійних напівтонких зрізах яєчників від кожної тварини. Досліджувався кожний 5-й зріз серії, тобто в розрахунках на кожну тварину враховувалось 10 зрізів яєчника. Прийнята процедура, за умов її коректного відтворення для кожного препарату яєчника, нівелювала можливі похибки. Вони могли спричинюватися, зокрема, відмінностями орієнтації площин зрізів та глибини їхнього проходження через товщу яєчника. В цей спосіб підвищувалась і гарантія одержання достатньо репрезентативних оцінок чисельності примордіальних фолікулів у кожному дослідженому випадку.

Загальний план і матриця дослідів представлені в таблиці 1. Для кожного з 8 варіантів експерименту використано матеріал від 6 тварин.

Таблиця 2  
Зміни середньої чисельності незрілих ооцитів у зрізах яєчників у факторному експерименті

| Варіант досліджу | Фактор |   |   | Середня чисельність ооцитів |
|------------------|--------|---|---|-----------------------------|
|                  | А      | В | С |                             |
| 1                | -      | - | - | 71,0                        |
| 2                | +      | - | - | 4,6                         |
| 3                | -      | + | - | 18,2                        |
| 4                | +      | + | - | 19,2                        |
| 5                | -      | - | + | 57,4                        |
| 6                | +      | - | + | 14,4                        |
| 7                | -      | + | + | 111,8                       |
| 8                | +      | + | + | 28,0                        |

### Результати й обговорення

Популяція примордіальних яйцеклітин демонструє широкий спектр ультраструктурних ефектів, викликаних чинниками повного трифакторного дворівневого експерименту. При цьому жодний клас органел у клітинах не може бути використаний як маркерний для надійної кількісної оцінки ефектів окремих факторів, а також ефектів взаємодії між ними. Пояснення в тім, що в окремих варіантах досліджу процеси розпаду клітин перебували на тій стадії, коли їхній вміст був представлений детритом, у якому неможливо було вже ідентифікувати будь-які органели.

Отже, електронні мікрофотографії могли бути основою, головним чином, для висновків про міру сповільнення фармпрепаратами процесів деструкції яйцеклітин. Що стосується критерію для кількісних визначень ефектів, то за даних умов з цією метою доцільніше було скористатися відносною чисельністю примордіальних фолікулів. Відтак, саме цей показник і було враховано для розрахунків коефіцієнтів регресії за результатами багатфакторного експерименту.

Результати вимірювань чисельності примордіальних ооцитів зведено в таблиці 2. Дані обчислень відповідних коефіцієнтів регресії для кожного з досліджених факторів і міжфакторних взаємодій першого та другого порядків (за допомогою комп'ютерної програми "Statgraphics") наводяться в таблиці 3.

Таблиця 3  
Оцінки факторних ефектів (у коефіцієнтах регресії) на середню чисельність незрілих ооцитів у зрізах яєчників

| Фактор                      | ave*  | А      | В    | АВ   | С     | АС     | ВС    | АВС    | Довірчий інтервал, ± |
|-----------------------------|-------|--------|------|------|-------|--------|-------|--------|----------------------|
| Середня чисельність ооцитів | 48,57 | -48,57 | 7,45 | 6,65 | 24,65 | -15,35 | 26,55 | -27,05 | 30,5                 |

\* ave — середнє арифметичне з усіх N результатів для відповідної вибірки, яке не належить до ефектів будь-якого з факторів або їх взаємодії, але вноситься в математичну модель процесу — відгуку дослідженої системи.

Загальновідомо, що експеримент з одним фактором нечасто розглядається як адекватно повторений, якщо тільки він не має близько 8 об'єктів — експериментальних тварин, ділянок тощо — на кожному рівні. В даній роботі використовувалась одинична репліка для кожного з варіантів 3-факторного плану. Хоч для кожного такого варіанту бралось відповідне середнє арифметичне значення від обстежень на 3-х тваринах, цей момент, звичайно, потребує пояснення. Справді, кожна досліджена комбінація рівнів факторів, яка представлена єдиним рядком у матриці планування, унікальна, вона не повторюється в жодному з решти рядків табл. 1. Тому необхідно коротко розглянути деякі основи одиничної репліки у дворівневих багатофакторних планах і обговорити питання, на наш погляд, обов'язкові для кожного кількісного дослідження: наскільки репрезентативними є одержані дані, яка спроможність фактичного матеріалу загалом, наскільки він вільний від можливих систематичних похибок.

Коли рівні фактора виражені кількісно, повну залежність функції відгуку від факторів дає багатомірна регресія. У дворівневих багатофакторних планах  $p$ -факторна взаємодія приблизно пропорційна похідній  $p$ -го порядку функції регресії по кожній з  $p$  включених змінних. Зрозуміло, що її вплив зменшуватиметься при зростанні  $p$ , якщо рівняння регресії наближено поліноміальне. Ця залежність дозволяє планувати експерименти одиничною реплікою, єдиним об'єктом для кожної комбінації рівнів факторів, що орієнтує дослідника на планування, "насичене" факторами, як кращий план експерименту.

Кількість реплік для повного дворівневого 3-факторного плану детально і багаторазово обговорювалось у літературі. В цьому плані для кожного з 3-х факторів є 4 експерименти, де даний фактор перебуває на нижньому рівні, й інші 4 досліді, де він знаходиться на верхньому рівні. При цьому в кожній четвірці дослідів інші фактори варіюють у чітко детермінованій комбінації. Тим самим забезпечується четверо повторень дослідів, що в них будь-який з факторів досліджується на нижньому рівні, і четверо повторень дослідів з підвищеним рівнем того ж самого фактора. Завдяки такій структурі плану необхідність обов'язкового дублювання дослідів відпадає.

Проте коректне число необхідних реплік може бути встановлено тільки на основі розгляду стандартних похибок, пов'язаних з величинами ефектів, що підлягають дослідженню. Звернімося після цих попередніх зауважень до аналізу значимості розрахованих оцінок ефектів факторів і їх взаємодій.

Статистична перевірка значень коефіцієнтів регресії має на меті виявити значущі коефіцієнти регресії серед знайдених. Інакше кажучи, вона має встановити, які з них із достовірністю 95 % відрізняються од нуля. Відповідна процедура базується на особливості багатофакторного плану: для всіх коефіцієнтів регресії, розрахованих за результатами багатофакторного експерименту, дисперсія однакова і визначається як частка від ділення дисперсії середнього відгуку на число дослідів у плані.

Звідси виходить, що значимі або суттєві коефіцієнти, які перебувають за межами того довірчого інтервалу, в якому "істинне значення" вимірюваної величини, підпорядкованої нормального закону, може виявитися з вірогідністю  $1-\lambda$ , де  $\lambda$  — так званий рівень значимості, який вибирають переважно рівним 0,05. Іншими словами, значущим можна вважати коефіцієнт регресії лише за умови, коли його абсолютна величина перевищує позитивну величину вказаного довірчого інтервалу. Останній розраховується як добуток квадратного кореня дисперсії коефіцієнта регресії на значення  $t$ -критерію для обраної величини  $\lambda$  числа ступенів свободи в досліді ( $N-1$ ).

В нашому випадку дисперсія коефіцієнтів регресії є 167,4. Для  $\lambda = 0,05$  і числа ступенів свободи 7  $t$ -критерій дорівнює 2,37. Звідси позитивне значення довірчого інтервалу для статистичної оцінки значущості коефіцієнтів регресії є 30,5. Порівнявши з останнім отримані оцінки факторних ефектів, можна стверджувати таке.

Абсолютні значення більшості коефіцієнтів регресії виявилися меншими за величини обчисленого довірчого інтервалу. Суттєвим, цебто таким, що перевищив величину довірчого інтервалу, виявився тільки коефіцієнт регресії при факторі  $A$  (радіація). Відтак, тільки його є підстави включити в рівняння регресії.

Рівняння регресії, як відомо, встановлює форму і значущість функціональних відношень між двома чи більшим числом змінних і в загальному випадку має вигляд:

$$Y = a + bX,$$

де  $Y$  — залежна змінна,

$a$  — так званий інтерцепт (відрізок, який знаходиться між двома точками; підставивши  $X = 0$ , отримуємо  $a = Y$ , або точку на координаті, в якій цю вісь перетинає лінія досліджуваної функції);

$b$  — коефіцієнт регресії;

$X$  — незалежна змінна.

Прийнявши, що  $a = 0$ , отримуємо  $Y = bX$ . Прийнявши  $a = 0$  і  $b = 1$ , отримуємо  $Y = X$ . Зі сказаного з'ясовується статистичний зміст  $b$ . Для аналітичної геометрії  $b$  є нахил функції  $Y = a + bX$ . Нарешті,  $b$  можна вважати похідною тієї ж функції ( $b = dY/dX$ ).

В конкретних дослідженнях у рівняння регресії включаються тільки статистично значущі ефекти (в тому порядку, в якому вони перераховані вище), а також і коефіцієнт “а” (average — середнє арифметичне із усіх  $N$  результатів експерименту). При цьому в рівняння кожний статистично значущий ефект вводиться у вигляді добутку одержаного коефіцієнта регресії з його знаком на умовне позначення відповідного фактора або взаємодії (великі літери латинського алфавіту). Таким чином, кожному членові рівняння можна поставити у відповідність поняття головного або лінійного ефекту фактора та ефекту взаємодії факторів.

Враховуючи ці рекомендації теорії, можна так записати для нашого випадку рівняння регресії або так звану формулу процесу, включивши до неї тільки статистично значущі ефекти:

$$y = 40,57 - 48,05 A,$$

де  $y$  — величина відгуку (середня чисельність примордіальних ооцитів).

Щоб прокоментувати приведені рівняння й уникнути можливих непорозумінь через відсутність єдиної термінології в літературі з математичного планування, коротко означимо насамперед принципи обчислення головних ефектів і ефектів взаємодії в багатфакторних експериментах.

Головний або лінійний ефект будь-якого фактора є середня різниця у відгуку між усіма комбінаціями, які містять даний фактор на верхньому рівні, і всіма комбінаціями, в яких він є на нижньому рівні. Відповідно, головний або лінійний коефіцієнт регресії при даному факторі кількісно дорівнює половині цієї різниці. Двофакторна взаємодія, наприклад  $AB$ , визначається як різниця між головним ефектом фактора  $A$  при верхньому рівні фактора  $B$  і при нижньому рівні фактора  $B$ . А от коефіцієнт регресії при  $AB$  дорівнює половині цієї різниці. Аналогічно, трифакторну взаємодію можна визначити як різницю між двома вимірами двофакторної взаємодії, одержаними при двох рівнях третього фактора.

Звертаючись тепер до нашого рівняння регресії, розглянемо передовсім наявний у ньому лінійний ефект. Із усіх досліджених факторів для одної тільки радіації (фактор  $A$ ) головний або лінійний коефіцієнт регресії одержав знак мінус. Величина цього коефіцієнта перевищила межі довірчого інтервалу, що виправдовує визнання її як статистично певної з достовірністю 95%. Негативний знак коефіцієнта регресії вказує, що за впливом на вивчену функцію відгуку досліджений інтервал доз знаходиться в пригнічуваль-

ній області. Іншими словами, підвищення величини дози в досліджених її межах статистично певно призводить до зменшення в яєчниках чисельності примордіальних ооцитів.

Стосовно кількісної оцінки дії опромінення можна висловити такі міркування. Коефіцієнти регресії за всіх добутків факторів виявились неістотними. Тож, згідно з теорією математичного планування, можна стверджувати таке. Переміна дози на дві одиниці варіювання в кодованих змінних (тобто від  $-1$  до  $0$  і від  $0$  до  $+1$ , де  $0$  — центр варіювання), або від  $30$  сГр до  $100$  сГр в натуральних змінних викликає зміну функції відгуку — відносної чисельності примордіальних яйцеклітин — на подвоєну величину коефіцієнта регресії, тобто на  $2 \times 48,05$ , незалежно від рівня інших факторів.

Щодо фармпрепаратів, використаних у процедурі верифікації, можна констатувати наступне.

Позитивний знак при статистичних оцінках ефектів сукцинату натрію ( $B$ ) і цитрату натрію ( $C$ ) відображає тенденцію безперечного зменшення пошкоджувальної дії радіації на яйцеклітині. Це повністю узгоджується з відомими даними літератури, що обґрунтовують радіаційно-протекторну дію цих природних метаболітів енергетичного обміну. Зауважимо разом недостатню значущість величини обчислених коефіцієнтів при отих факторах. Вона вказує на те, що при опроміненні тварин у діапазоні застосованих доз препарати виявились неспроможними статистично суттєво запобігти радіаційному пошкодженню чи істотно пом'якшити його статистично.

### Підсумок

Дані факторних експериментів представляють статистично певні й високо достовірні підстави для таких висновків.

1. Запропонований екологічний клітинний маркер відрізняється насправді високою чутливістю до малих доз гама-опромінення.
2. Маркер надає можливість надійної кількісної оцінки відгуку на підвищення дози в інтервалах  $30$ — $100$  сГр за відносною чисельністю примордіальних яйцеклітин, що вижили після зовнішнього загального гама-опромінення.
3. Верифікація маркера в експериментах за повним 3-факторним планом ствердила коректність та адекватність відображення ним загальної біологічної реакції на радіоактивне опромінення та модифікації такої реакції за допомогою радіопротекторних природних метаболітів.

*Malyuk V. I., Stechenko L. O., Kuftyreva T. P., Bidna L. P.*

**THE VERIFICATION  
OF THE ECOLOGICAL CELL MARKER  
OF LOW RADIATION DOSES**

Experiments were performed on juvenile rats according to the 3-factorial design. The animals were irradiated with  $^{60}\text{Co}$  rays in doses of 30 and 100 cGy and were given succinate Na and citrate Na with their mother's milk. Multifactorial effects on quantity of live able primordial follicles in ovaries were studied for 1 and 5 days after radiation exposure. Results of the verification indicated that the proposed marker is highly sensitive to radiation and is able to reflect correctly and adequately general biological reaction to radiation and its modification with radioprotective metabolites.