

**ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АССОЦИИРОВАННЫХ СО
ЗДОРОВЬЕМ РЕФЕРЕНСНЫХ ИНТЕРВАЛОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Верведа А.Б., Бельская А.В., Зайцева М.А., Вихарев Ю.Б., Горбунова Л.В, Кубарская Л.Г.,
Дьякова А.В.

*ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»
(192019, Санкт-Петербург, Российская Федерация)*

В статье обоснованы подходы к определению референсных интервалов биометрических признаков лабораторных животных и основные направления их использования при проведении научных токсикологических исследований. Показано, что процедура установления референсных интервалов нормативно закреплена в международных и отечественных документах и они широко используются в клинической практике. В то же время методическая база получения и применения референсных интервалов при проведении экспериментальных токсикологических исследований представлена недостаточно полно. Возрастание значимости доклинического этапа разработки лекарственных препаратов, например, в сфере исследования эффективности и безопасности антидотов, которые возможны преимущественно на лабораторных животных, требует повышения обоснованности принимаемых решений. Реализация методических подходов и установление референсных интервалов на базе научно-исследовательского учреждения позволит повысить качество доклинического этапа разработки лечебных и профилактических фармакологических препаратов, а также интерпретации результатов токсикологических исследований на основе интегральной оценки состояния организма лабораторных животных.

Ключевые слова: референсный интервал, лабораторные животные, токсикологическое исследование, интерпретация результатов, количественная интегральная оценка

**MAIN AREAS FOR USING HEALTH-ASSOCIATED REFERENCE INTERVALS
FOR TOXICOLOGICAL STUDIES.**

Verveda A.B., Belskaia A.V., Zaytseva M.A., Vikharev Yu.B., Gorbunova L.V.,
Kubarskaya L.G., Diakova A.V.

«Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency of Russia

The article substantiates the approaches to determining the reference intervals of biometric features of laboratory animals and the main directions of their use in conducting scientific toxicological studies. It is shown that the procedure for establishing reference intervals is normatively fixed in international and domestic documents and they are widely used in clinical practice. At the same time, the methodological basis for obtaining and using reference intervals during experimental toxicological studies is not fully represented. The increasing importance of the preclinical stage of drug development, for example, in the study of the effectiveness and safety of antidotes, which are possible mainly in laboratory animals, requires an increase in the validity of decisions. The implementation of methodological approaches and the establishment of reference intervals on the basis of a research institution will improve the quality of the preclinical stage of the development of therapeutic and preventive pharmacological preparations, as well as interpretation of the results of toxicological studies based on an integrated assessment of the state of the organism of laboratory animals.

Key words: reference interval, laboratory animals, toxicological study, interpretation of results, quantitative integral assessment

Введение

Система понятий, связанная с референсными значениями (РЗ), референсными интервалами (РИ) нашла применение в современной клинической лабораторной диагностике и медицине в целом. Принятию медицинских решений в значительной степени (по некоторым данным от 60-70 % [1] до 80 % случаев [2]) способствует использование данных лабораторных исследований. Основой для интерпретации лабораторных показателей медицинскими работниками являются РИ, однако их прямой перенос, например, из инструкций по использованию реактивов, на данные другой популяции может стать причиной принятия необоснованных решений [3, 4].

Международные руководства [5] и отечественные стандарты в области лабораторных клинических исследований [6] рекомендуют порядок и предписывают устанавливать РИ аналитов непосредственно в организации, что определяет целесообразность получения РЗ в других сферах медицинской и научной деятельности.

В результате многолетней научно-исследовательской работы в большинстве научных учреждений, в частности в ФГБУН ИТ ФМБА России (далее – Институт), накоплены данные о клиническом, лабораторном, физиологическом и морфологическом статусе экспериментальных животных, позволяющие сформировать базу данных РИ биометрических признаков.

Целью исследования явилось обоснование подходов к определению РИ биометрических признаков лабораторных животных и основных направлений их использования при проведении научных токсикологических исследований.

Общие понятия о референсных интервалах

Во второй половине 20 века R. Grasbeck в соавторстве с J. Fellman и N.E. Saris опубликовал работы, положившие начало исследованиям в области референсных значений [7, 8]. Необходимость разработки концепции референсных значений была обусловлена несовершенством, с научной точки зрения, концепции нормальных значений [9, 10]. Руководство 2008 г., разработанное специалистами Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) и Международной Федерации Клинической Химии (IFCC), стало наиболее значимым шагом в развитии концепции референсных значений и актуально до настоящего времени [5].

Концепцию референсных значений можно сформулировать как «установление и использование релевантных данных для интерпретации медицинских наблюдений» [9]. Не раскрывая подробно содержание представленной концепции, основные положения которой в настоящее время научно обоснованы [11] и реализованы в виде нормативных документов [5,6], хотелось бы обратить внимание на ряд важных, на наш взгляд, положений.

Термин «референсные значения» не должен приравниваться к термину «нормальные значения» прежде всего в связи с тем, что референсные значения могут быть определены для индивидов с различным состоянием здоровья, включая больных, то есть для получения РЗ необходимо, в первую очередь, задать критерии отбора. Для обозначения РЗ (РИ), полученных от здоровых индивидов, рекомендуется использовать термин «ассоциированные (соотнесенные) со здоровьем референсные значения (референсные интервалы)» [12].

В работе С.А. Евгиной и Л.И. Савельева отмечено, что «по своему определению РИ предназначен быть зеркалом популяции и не может служить критерием суждения о здоровье или патологии» [13]. Поэтому РИ биометрических признаков являются, безусловно, важными показателями, но являются источниками первичной информацией для принятия клинических решений, особенно учитывая,

что состояние здоровья характеризует не один признак, а множество различных параметров.

Порядок установления референсных интервалов

Значительная часть международных рекомендаций, посвященная вопросам установления РИ, как было упомянуто ранее, представлена в сфере клинической лабораторной диагностики. Одним из основных отечественных документов в этой области является ГОСТ Р 53022.3-2008 [6].

Необходимо отметить, что нормативных документов, посвященных вопросам установления РИ биометрических признаков в области экспериментальных исследований на лабораторных животных, включая сферу токсикологии, в доступных информационных базах данных найти не удалось. В научной литературе, посвященной вопросам токсикологии, термины РИ, РЗ чаще используется применительно к содержанию токсиканта в биологических средах организма, чем по отношению к биометрическим признаками [14].

Порядок проведения процедур для определения РИ клинических лабораторных показателей представлен в документе IFCC [4]. Основываясь на подходах к формированию РИ в медицине, Американским обществом ветеринарной клинической патологии (ASVCP) были разработаны рекомендации по определению референсных интервалов в ветеринарных науках, которые представлены в работе R.F. Kristen и соавторов [15]. Обобщая представленные в клинических и ветеринарных руководствах подходы, можно выделить основные этапы формирования ассоциированного со здоровьем референсного интервала, которые представлены на рисунке 1.



Рисунок 1 – Этапы формирования ассоциированного со здоровьем референсного интервала биометрического признака

По мнению С.А. Евгиной и Л.И. Савельева «критерии включения/исключения являются одним из самых дискуссионных моментов в исследованиях по определению РИ» [13]. Применительно к решаемым в настоящей работе задачам это связано с несколькими положениями:

- субъективизм исследователя при выборе критериев отбора, связанный с отсутствием четкого определения здоровья вообще и условно здорового животного в частности;
- ограниченный объем диагностических процедур при оценке состояния здоровья лабораторного животного, допускаемого в эксперимент;
- финансовые и организационные проблемы, связанные с возможным применением жестких процедур отбора для набора референсных особей.

В работе R.F. Kristen и соавторов предложены критерии для отбора референсных индивидов для решения задач ветеринарии [15]. В качестве критериев включения представлены биологический (возраст, пол, порода, линия, поставщик), клинический (анамнез, профилактические мероприятия, состояние здоровья) и географический (климат, условия содержания) признаки. К критериям исключения отнесены биологические (голодание, стресс), физиологический (лактация, беременность) и лекарственный

признаки (прием гормонов). Принимая эти рекомендации за основу целесообразно доработать критерии включения/исключения с учетом специфики лабораторных животных, в частности, в качестве критерия исключения использовать результаты некропсии при непрямом методе установления РИ.

Методы определения референсных интервалов

Существующие в настоящее время методы определения РИ можно свести к двум подходам – прямой и непрямой (косвенный) [13].

Прямой метод предполагает целенаправленный отбор референсных индивидов по заданным критериям, получение референсных значений и их последующую статистическую обработку для получения РИ. Действующие отечественные стандарты [6] и международные руководства [5, 15] посвящены преимущественно прямому методу получения РИ, но он имеет ряд недостатков:

- возможные сложности при наборе необходимого количества референсных индивидов, особенно относящихся к специфическим группам (крайние возрастные категории, беременность так далее);
- получение РИ не для всех категорий индивидов, относящихся к обслуживаемой популяции;
- финансовые издержки и временные затраты на проведение не связанных с повседневной деятельностью процедур.

Непрямой метод основан на использовании накопленного массива данных, анализе имеющейся информации и применении специфических методов статистической обработки для получения РИ, включая применение статистических подходов Data Mining [16, 17]. Однако представленный метод также не лишен существенных недостатков:

- относительная неполнота информации о характеристиках индивидов в сравнении с целенаправленно рекрутируемыми индивидами;
- сложность реализации единых подходов к стандартизации преаналитических и аналитических процедур, проходивших в различные временные промежутки;
- возможность исключения индивидов, относящихся к «нездоровой» популяции, преимущественно за счет статистических методов.

Основными характеристиками, влияющими на выбор процедуры установления РИ, являются размер и характер распределения выборки. В обобщенном виде влияние сочетания этих основных параметров на процедуру установления РИ представлены в таблице 1.

Таблица 1

Рекомендуемые процедуры установления РИ на основе размера и распределения

референсной выборки [15]

Размер выборки	Распределение данных	Статистический метод
≥ 120	Не оценивается	Непараметрический с 90 % доверительным интервалом (ДИ) для референсных пределов (РП)
$40 \leq x < 120$	Нормальное	Робастный с 90 % ДИ для РП
		Параметрический с 90 % ДИ для РП
	Ненормальное	Робастный с 90 % ДИ для РП (предпочтительно)
		Непараметрический*
$20 \leq x < 40$	Нормальное	Параметрический с 90 % ДИ для РП
	Ненормальное	Робастный с 90 % ДИ для РП
$10 \leq x < 20$	Не применимо	РИ не рассчитывают
< 10	Не применимо	Не репортируют референсные значения
Примечание * – Для референсной выборки численностью менее 120 индивидов 90 % ДИ с использованием непараметрических методов не определяют; используют альтернативный метод, например, бутстреп		

Дополнительно к представленным в таблице 1 условиям использования соответствующих распределению и объему выборки методов статистической обработки необходимо отметить, что, по мнению Y. Ozarda и соавторов, при больших объемах выборки возможно применение и параметрических методов анализа [18]. Численность таких выборок должна включать более 200 референсных индивидов, так как при меньших размерах авторы отмечают нестабильность параметрического метода.

Основные направления использования референсных интервалов биометрических признаков в экспериментальной токсикологии

Апробированные подходы к формированию референсных популяций, статистическим методам обработки РЗ, как в клинической практике, так и «рутинной» ветеринарии, безусловно, необходимо принимать за основу при разработке информационных баз РИ в научных учреждениях. Однако представленные подходы нуждаются в обязательной адаптации, учитывающей специфику проведения исследований на лабораторных животных.

Для решения задачи формирования реестра РИ в Институте целесообразно использовать прямой и непрямой методы получения референсных пределов.

С применением непрямого метода на основе ретроспективного анализа существующих информационных баз данных можно получить РИ по основному объему

количественных показателей. Для устранения недостатков метода необходимо сформировать критерии отбора признаков и организовать их применение после разработки соответствующей стандартной операционной процедуры.

Прямой метод целесообразно использовать на основе целенаправленного применения критериев отбора для переменных, объем которых будет недостаточен для корректного анализа непрямым методом, или биометрических признаков, которые ранее оценивались качественно. Представленный подход также может быть использован для верификации РИ, полученных после формирования референсных популяций непрямым способом.

Принимая во внимание, что формирование критериев включения/исключения как для клинической медицины, так и других сфер деятельности, является задачей, решаемой в соответствии с целью исследований и не имеет универсального подхода, установление аналогичных признаков для лабораторных животных при проведении токсикологических и фармакологических исследований целесообразно осуществлять на основе экспертной оценки научными сотрудниками.

В целом методические подходы к установлению РИ биометрических признаков лабораторных животных нуждаются в систематизации и включению в методические документы, которые могут быть использованы научными учреждениями различной ведомственной принадлежности для формирования реестров РЗ. Разработка и, конечно, принятие единого методического подхода к формированию РИ может стать основной для создания научно обоснованной верифицированной обобщенной базы референсных значений биометрических признаков.

Полученные РИ биометрических признаков лабораторных животных могут быть использованы в различных направлениях научной и практической деятельности.

В сфере клинической лабораторной диагностики изолированный анализ отклонений отдельных индивидуальных значений от РИ является скрининговым диагностическим методом. Показатели состояния организма здоровых индивидов (ассоциированные со здоровьем РИ) являются составной частью систем поддержки принятия врачебных решений для диагностики патологических процессов, используемых в нашей стране и за рубежом [19]. Общедоступных программных продуктов, помогающих принимать решения в области клинической и экспериментальной токсикологии нам найти не удалось.

Для оценки результатов доклинических исследований лекарственных препаратов, токсикологических и фармакологических экспериментов используются биометрические признаки лабораторных животных различного иерархического уровня и природы

(количественные, порядковые, качественные), включая динамические показатели, что определяет необходимость комплексного анализа полученных данных, характеризующих организм, как целостную систему. В настоящее время отсутствует единый подход к количественной интегральной оценке результатов токсикологического эксперимента, что обусловлено, как объективными трудностями анализа и интерпретации значительного объема разнородной информации, так и с рядом других факторов, связанных с темой настоящей работы:

- нехваткой методических разработок по установлению РИ для лабораторных животных;
- недоверием к описанным в научной литературе «нормальным значениям» признаков, которые получены в результате обследования животных из различных питомников, на небольших выборках, без исходной информации о методах получения данных и используемом аппаратном обеспечении [20, 21];
- сокращением численности животных в группах, что связано как с рекомендациями нормативных документов [22], так и удорожанием экспериментальных исследований.

В то же время необходимо констатировать возрастание значимости экспериментов с лабораторными животными, в частности, на доклиническом этапе исследований отдельных групп лекарственных препаратов. По объективным причинам в процессе разработки лекарственных средств, предназначенных для медикаментозной защиты от воздействия высокотоксичных химических веществ, часто отсутствует возможность проведения в полном объеме клинических исследований этих препаратов [23]. При оценке профиля общей токсичности и эффективности внедряемого препарата большое значение придается валидности экспериментальных данных, полученных на лабораторных животных.

Таким образом, основным направлением использования РИ биометрических признаков лабораторных животных являются их включение в систему интегральной оценки результатов экспериментальных исследований. Схематично общий порядок принятия решений на основе РИ биометрических признаков и интегральных показателей состояния организма лабораторных животных представлен на рисунке 2.

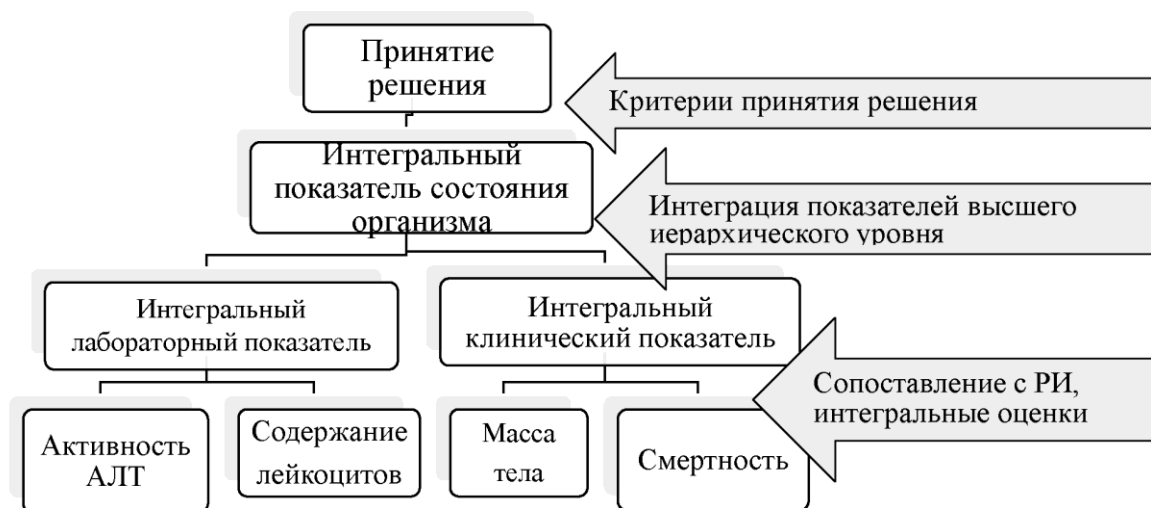


Рисунок 2 – Общий порядок принятия решений при проведении экспериментальных исследований

В качестве одного из методов интеграции показателей могут быть использованы функции принадлежности, в частности функция желательности Харрингтона, которые успешно применяются для решения задач в различных сферах деятельности [24, 25].

До разработки и внедрения системы интегральной оценки состояния организма лабораторных животных РИ в повседневной деятельности могут быть использованы для интерпретации выявленных отличий между исследуемыми группами по отдельным органам и системам. В случае установления статистически значимых различий между экспериментальными и контрольными животными, но при условии нахождения анализируемых признаков в исследуемых группах в пределах РИ, выявленные различия могут быть отнесены к клинически (научно) не значимым.

Референсные интервалы могут быть использованы на этапе предварительного отбора животных перед началом экспериментальных исследований. Принимая во внимание, что в повседневной практике наиболее часто в качестве критериев включения/исключения используются клинические признаки (масса тела, состояние шерсти и т.д.) возникает проблема количественной оценки клинического статуса. На основе анализа переменных, получаемых в ходе выполнения различных методик исследований в Институте, было установлено, что только 60 % из них (преимущественно лабораторные и физиологические показатели) относятся к количественным переменным, установление РИ для которых возможно на основе действующих нормативно-методических документов. Для значительной части клинических и большинства

морфологических признаков, описываемых качественно, необходима разработка шкал (балльной оценки), которые позволят преобразовать номинальные переменные в категориальные (ранговые) переменные. В результате такой трансформации появиться возможность установления верхнего (одностороннего) предела, характеризующего допустимые отклонения.

Заключение

Интерпретацию результатов токсикологических исследований целесообразно проводить не только на основе общедоступных «нормальных значений», но, преимущественно, с использованием РИ, установленных в научной организации.

Проведенный анализ научной литературы и нормативных документов по вопросам получения РИ и статистической обработки переменных в референсных выборках показал, что в клиническом и ветеринарном сообществах апробированы и широко используются прямой и непрямой методы получения РИ. Однако нормативных документов, посвященных особенностям установления РИ биометрических признаков в области экспериментальных исследований на лабораторных животных, в доступных информационных базах данных найти не удалось.

Подходы к установлению РИ биометрических признаков лабораторных животных нуждаются в адаптации и включению в методические документы, которые могут быть использованы научными учреждениями различной ведомственной принадлежности для формирования реестров РЗ. Принятие единого методического подхода к формированию РИ может стать основой для создания обобщенной базы референсных значений биометрических признаков.

Использование сформированных баз данных РИ биометрических признаков позволит повысить качество решения ряда научных и практических задач в сфере экспериментальной токсикологии:

- создать платформу для интегральной количественной оценки результатов токсикологических экспериментов;
- повысить качество интерпретации выявленных различий между исследуемыми группами животных по отдельным органам и системам;
- снизить затраты на проведение экспериментов путем априорного определения соответствия животного критериям отбора.

Список литературы

1. Меньшикова В.В., ред. Клинический диагноз – лабораторные основы. М.: Лабинформ, 1997.
2. Петрова О.В., Шашин С.А., Тарасов Д.Г. Референтные интервалы показателей системы гемостаза у взрослого населения астраханской области при применении автоматических коагулометров. ПОЛИКЛИНИКА. 2017; 4 (1): 40-2.
3. Казакова М.С., Луговская С.А. Референсные интервалы при применении современных гематологических анализаторов. Клиническая лабораторная диагностика. 2014; 9: 10-2.
4. Ridefelt P., Hellberg D., Aldrimer M., Gustafsson J. Estimating reliable pediatrics reference intervals in clinical chemistry and haematology. Acta Paediatr. 2014; 103 (1): 10-5.
5. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
6. ГОСТ Р 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. Available at: <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc&base=OTN&n=8881#010847410208015529>
7. Grasbeck R., Fellman J. Normal values and statistics. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968; 21: 193-5.
8. Grasbeck R., Saris N.E. Establishment and use of normal values. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1969; 26: 62-3.
9. Grasbeck R. Референсные значения: развитие концепции. Лабораторная медицина. 2011; 11: 79-83.
10. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Scientific Committee, Clinical Section, Expert Panel on Theory of Reference Values, and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Standing Committee on Reference Values. Approved Recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1987; 25: 337-42.
11. Siest G., Heimy J., Grasbeck R., Wilding P., Petitclerc C., Queraltd J., Petersen P. The theory of reference values: an unfinished symphony. Clin. Chem. Lab. Med. 2013; 51 (1): 47-64.

12. Dybkaer R., Solberg H.E. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Approved recommendation on the theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1987; 25: 657-662.
13. Евгина С.А., Савельев Л.И. Современные теория и практика референтных интервалов. *Лабораторная служба.* 2019; 8 (2): 36-44.
14. Малов А.М., Иванова Т.М., Семенов Е.В., Сизова К.В., Елаева Н.Л., Шестова Г.В. О допустимых референсных значениях ртути в крови человека. *Здоровье и окружающая среда.* 2009; 13: 390-5.
15. Kristen R.F., Kendal E.H., Kathy P.F., Balazs S., Raquel M.W., Kirstin F.B. et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet. Clin. Pathol.* 2012; 41 (4): 441–53.
16. Hoffmann R.G. Statistics in the practice of medicine. *J. Am. Med. Assoc.* 1963; 185: 864-73.
17. Bhattacharya C.A. Simple method of resolution of a distribution into Gaussian components. *Biometrics.* 1967; 23: 115-35.
18. Ozarda Y, Higgins V, AdeU K. Verification of reference intervals in routine clinical laboratories: practical challenges and recommendations. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2018; 57 (1): 30-7.
19. Гусев А. В., Зарубина Т. В. Поддержка принятия врачебных решений в медицинских информационных системах медицинской организации. *Врач и информационные технологии.* 2017; 2: 60-72.
20. Трахтенберг И.М., Сова Р. Е., Шефтель В. О., Оникиенко Ф. А. Проблема нормы в токсикологии (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы). М.: Медицина; 1991.
21. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб.: Изд-во «ЛЕМА»; 2013.
22. Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22.10.2010 «О защите животных, использующихся для научных целей». Available at: <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc&base=INT&n=55621#048302825883656>
23. Алгоритм доклинических и клинических исследований специальных лекарственных средств (антидотов), предназначенных для применения в условиях чрезвычайных ситуаций, профилактики и лечения заболеваний и поражений, полученных в результате воздействия высокотоксичных химических веществ. Методические рекомендации. М.: ФМБА России; 2018.

24. Сосюкин А.Е., Верведа А.Б. Практические аспекты использования функции желательности при проведении психофизиологического обследования персонала аварийно-спасательных формирований. Биомедицинский журнал Medline.ru. 2015; 16 (78): 872-884.

25. Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановский Ю.В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. М.: Наука; 1976.