

Использования теста на однородность планшетов для вывода критериев приемлемости постановок

При разработке [теста](#) на ингибирование выброса интерлейкина при прайминге и активации инфламмосомы NLRP3 в дифференцированных с помощью PMA клетках THP-1, мы столкнулись с проблемой определения "приемлемости" разработанной методики. Под приемлемостью методики имеется в виду следующее:

1. Величина сигнала должна значимо отличаться от сигнала фона.
2. Величина сигнала в лунке не должна зависеть от расположения лунки на планшете.
3. Если в несколько разных планшетов налить одно и то же, результаты должны быть близкими.
4. Результаты, полученные в разные дни должны быть близкими.

В литературе мы нашли описание метода 3-х дневной оценки однородности планшетов, позволяющий численно оценить эти параметры:



Оценка применимости и валидация методик скрининга соединений

Конспект [главы](#) из Assay Guidance Manual

These techniques are intended to be applied to ≥ 96 -well primary and functional assays.

3-дневная оценка однородности планшетов

Для всех методик должна проводиться оценка однородности планшета. Для новых методик исследование однородности планшета следует проводить в течение 3 дней, чтобы оценить однородность и качество разделения сигналов, с использованием концентрации ДМСО, которая будет использоваться при скрининге. Анализ однородности следует проводить при максимальном и минимальном уровнях сигнала или отклика, чтобы гарантировать, что окно сигнала адекватно для обнаружения активных соединений во время скрининга.

- **"High": максимальный сигнал.** В in vitro методах, которые измеряют связывание рецептора и лиганда или активность фермента с превращением субстрата в продукты, максимальный сигнал представляет собой отклик в отсутствие тестируемых соединений.
- **"Low": фоновый сигнал.** В in vitro методах, которые измеряют связывание рецептора и лиганда или активность фермента с превращением субстрата в продукты, минимальный сигнал представляет собой отклик в отсутствие тестируемых соединений, меченого лиганда или субстрата.
- **"Mid": сигнал между максимальным и минимальным сигналами.** В in vitro методах, которые измеряют связывание рецептора и лиганда или активность фермента с превращением субстрата в продукты, этот параметр представляет собой средний отклик, измеренный с использованием концентрации EC_{50} контрольного соединения.

N.B Если для измерения активности соединения требуется калибровка аналитических сигналов, максимальные, минимальные и средние сигналы должны соответствовать откликам калибровочной кривой, а не сырому отклику, считанному ридером. Требуется, чтобы необработанные сигналы находились в пределах диапазона калибровочной кривой. Не более 1-2% лунок может находиться за пределами диапазона калибровки (т. е. выше уровня верхнего плато или ниже уровня нижнего плато калибровочной кривой).

В главе описано два формата для изучения однородности планшетов:

- **На планшетах с перемежающимся сигналом**, где все сигналы находятся на всех планшетах, но систематически меняются таким образом, что на всех планшетах в заданный день каждый сигнал измеряется на каждом планшете.
- **На планшетах с равномерным сигналом**, см [первоисточник](#)

Еще один вариант описан в главе по [ELISA](#).

Планшеты с перемежающимся сигналом

Предлагается следующий вариант для этого теста:

Plate 1

Row	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
1	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L
2	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L
3	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L
4	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L
5	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L
6	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L
7	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L
8	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L

H=Max, M=Mid, L=Min

Plate 2

Row	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
1	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
2	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
3	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
4	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
5	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
6	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
7	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
8	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M

H=Max, M=Mid, L=Min

Plate 3

Row	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
1	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H
2	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H
3	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H
4	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H
5	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H
6	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H
7	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H
8	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H

H=Max, M=Mid, L=Min

- Не изменяйте концентрацию, дающую сигнал Mid, в ходе валидации
- Испытания следует проводить в разные дни и использовать независимо приготовленные реагенты

Сводные расчеты сигналов и критерии приемки планшета

1. Выбросы очевидны и их меньше 2% лунок в каждом планшете
2. Рассчитать среднее (AVG), sd, и CV для каждого сигнала (Max, Min and Mid) в каждом планшете. CV рассчитывается, учитывая количество лунок для каждой концентрации каждого тестируемого соединения, которые будут использованы в скрининговых экспериментах. К примеру, если каждая концентрация тестового соединения будет исследована в k лунках

$$\text{AVG} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{well}_i}{n} \quad \text{sd} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\text{well}_i - \text{AVG})^2}{n-1}} \quad \text{CV} = \frac{\text{sd}}{\text{AVG}}$$

3. Критерий приемлемости:

CV ≤ 20% для каждого уровня сигнала

Для сигнала Min этот критерий часто не выполняется, поэтому можно использовать альтернативный критерий: $\text{sd}_{\min} \leq \min(\text{sd}_{\text{mid}}, \text{sd}_{\text{max}})$

4. Все планшеты должны соответствовать этим критериям (т. е. для сигналов Max и Mid CV ≤ 20% и для сигнала Min CV_{min} ≤ 20% или $\text{sd}_{\min} \leq (\text{sd}_{\text{mid}} \text{ и } \text{sd}_{\text{max}})$)

5. Для каждой лунки с сигналом Mid посчитать процент ингибирования по отношению к средним по планшету сигналам Max и Min

$$\% \text{Activity} = 100\% \frac{\text{well}_{\text{mid}} - \text{AVG}_{\text{min}}}{\text{AVG}_{\text{max}} - \text{AVG}_{\text{min}}} \quad \% \text{Inhibition} = 100\% - \% \text{Activity}$$

6. Посчитать среднее значение и sd для %Inhibition на каждом планшете.

Критерий приемки $\text{sd}_{\text{mid}(\% \text{Inh})} \leq 20$ на всех планшетах.

7. Для каждого планшета рассчитать Z':

$$Z' = 1 - 3 \frac{\text{sd}_{\text{max}} + \text{sd}_{\text{min}}}{\sqrt{k} (\text{AVG}_{\text{max}} - \text{AVG}_{\text{min}})}$$

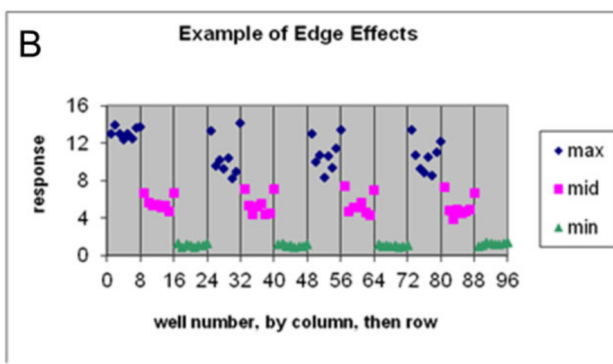
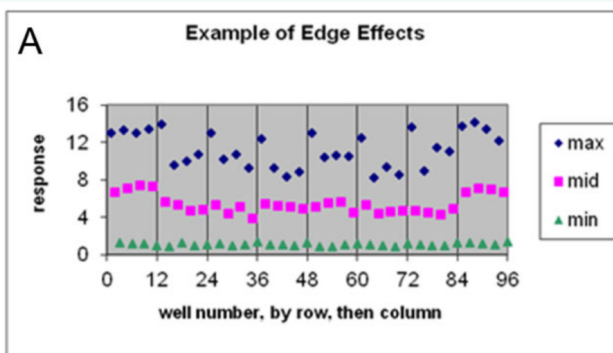
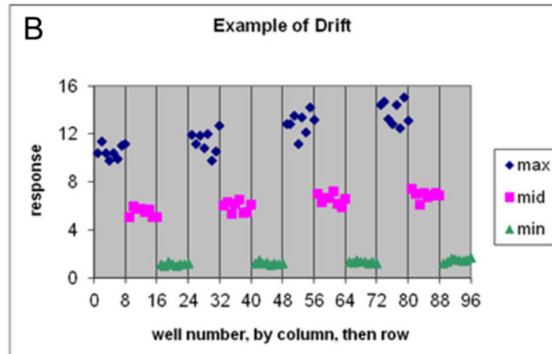
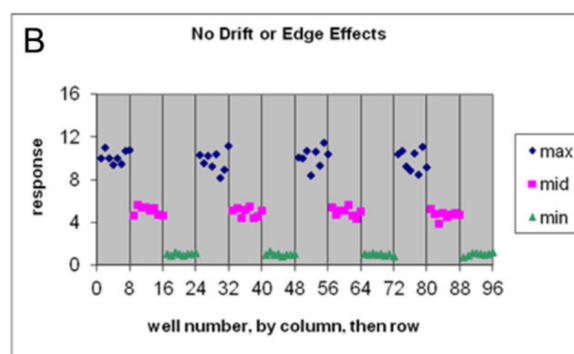
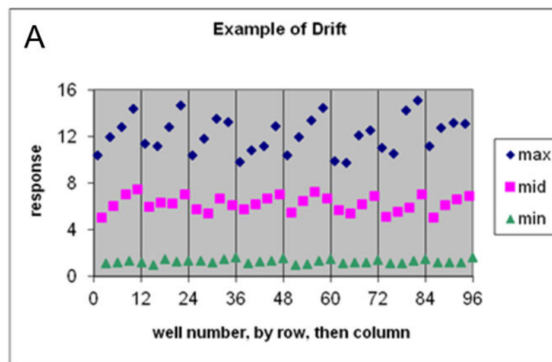
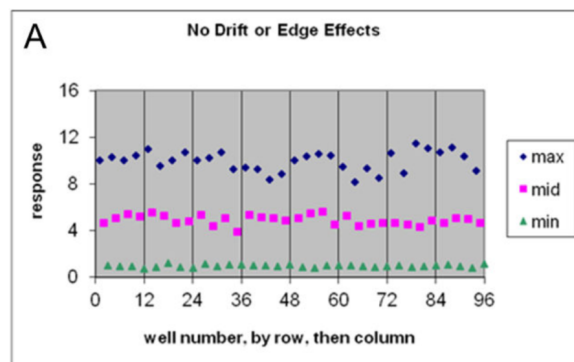
Критерий приемлемости: Z' ≥ 0.4

Подробнее про Z' можно почитать [тут](#) и [тут](#).

Оценка пространственной вариативности

Для выявления дрейфа, краевых эффектов и других систематических погрешностей нужно представить результаты измерений сигналов на графиках в виде облаков точек, где лунки упорядочены сначала по ряду (эффекты в одном ряду), потом по колонке и сначала в колонке, потом по ряду (эффект в одной колонке)

- Общее требование - на планшетах должен отсутствовать дрейф и краевые эффекты
- В общем случае дрейф и краевые эффекты размером < 20% считаются незначительными
- Эффекты, наблюдаемые лишь на одном или нескольких планшетах и не являющиеся доминирующим паттерном также не считаются значительными.



Дрейф

(возможно, что рассуждения про дрейф в большей степени применимо к автоматическим дозирующим системам)

Дрейф не должен превышать 20%. Чтобы детектировать дрейф необходимо рассмотреть High и Mid сигналы. Необходимо обратить внимание на сдвиги справа налево и сверху вниз. На среднем рисунке среднее колонки 1 = 10.6, а в колонке 10 - 13.8. Среднее по планшету = 12.2. Дрейф = $26\% [(13.8-10.6)/12.2]$, следовательно необходимо установить причины дрейфа и устранить их.

Краевые эффекты

Краевые эффекты могут вносить значительный вклад в вариабельность, поэтому стоит их замечать и избавляться от причин. Краевые эффекты иногда возникают из-за усиленного испарения из краевых лунок при длительном инкубировании. Также краевые эффекты могут возникнуть из-за слишком короткого инкубирования или из-за хранения планшетов стопкой – в таких условиях краевые лунки достигают желаемых температур быстрее, чем располагающиеся в глубине планшета. На последнем рисунке приведен пример краевых эффектов.

Вариабельность между планшетами и между постановками

Критерии приемлемости

1. На каждом планшете

$$CV_{\max} \text{ и } CV_{\text{mid}} \leq 20\%$$

$$CV_{\min} \leq 20\% \text{ или } sd_{\min} \leq \min(sd_{\text{mid}}, sd_{\max})$$

$$sd_{\text{mid}}(\% \text{Inh}) \leq 20,$$

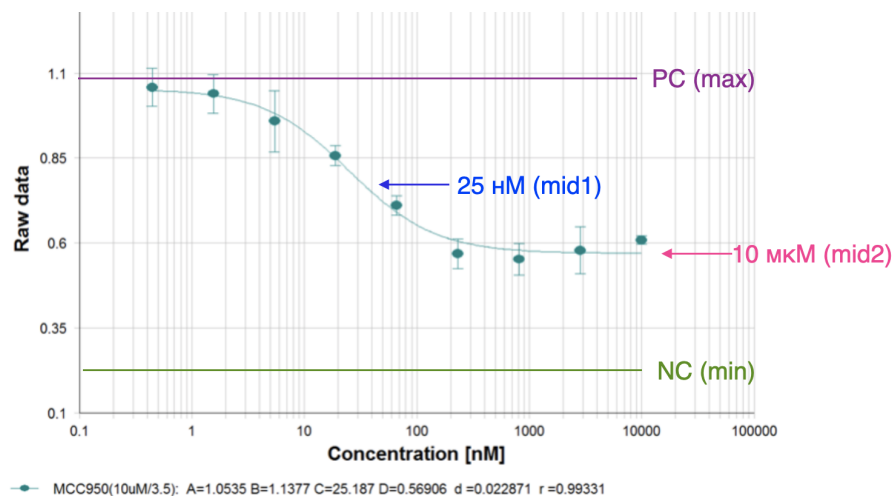
$$Z' \geq 0.4$$

Отсутствие или (незначительные) краевые эффекты, дрейф или другие пространственные эффекты

2. Между планшетами и между днями:

$\left(\frac{\% \text{Inh}_1}{\% \text{Inh}_2} < 2\right)$ между планшетами в один день и между днями. Могут быть нюансы для соединений, у которых наклон титровочных кривых отличен от 1, см [первоисточник](#)

В отличие от предложенной в литературе схемы, мы использовали 4 уровня сигнала, потому что в нашем случае даже при максимальной концентрации ингибитора не удастся добиться полного ингибирования:



Таким образом, мы использовали следующие сигналы:

- PC (max) - сигнал от при прайминге и активации клеток (LPS + ATP) в отсутствие ингибитора;
- 25 nM (mid1) - сигнал при прайминге и активации + 25 nM MCC950 (примерно соответствует точке перегиба на титровочной кривой);
- 10 μM (mid2) - сигнал при прайминге и активации + 10 μM MCC950 (примерно соответствует нижнему плато);
- NC (min) - сигнал без прайминга и активации.

Также мы использовали не все лунки - краевые заливаются средой для снижения испарения жидкости с планшета:

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
1												
2		NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	
3		NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	
4		NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	
5		NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	
6		NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	
7		NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	
8												

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
1												
2		25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	
3		25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	
4		25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	
5		25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	
6		25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	
7		25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	
8												

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
1												
2		PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	
3		PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	
4		PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	
5		PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	
6		PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	
7		PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	
8												

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
1												
2		10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	
3		10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	
4		10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	
5		10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	
6		10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	
7		10	NC	PC	25	10	NC	PC	25	10	NC	
8												

Мы оптимизировали наш тест и успели провести 3 **итоговых** эксперимента на однородность планшетов, которые условно удовлетворили представленным выше критериям. Это довольно много данных и хотелось бы их использовать! Мы подумали, что могли бы вывести из этих данных критерии качества для дальнейших постановок, в которых уже будут только титровки кандидатов, контрольного соединения MCC950 и по три лунки на планшет сигналов PC и NC. В каждой постановке мы начинаем титровку MCC950 с концентрации 10 мкМ. Эту же концентрацию мы использовали в тестах на однородность планшетов. Таким образом, мы можем постараться определить, какие значения %ингибирования при 10 мкМ MCC950 мы получали в валидационных экспериментах по однородности планшетов и сравнивать с ними значения, получаемые в рутинных постановках. **Это критерий качества постановки №1.**

Так же из валидационных экспериментах по однородности планшетов мы хотели бы оценить **разброс данных**, который свойственен нашей методике. Это удобно сделать с помощью метрики CV, введенной выше. Из-за того, что она является относительной, можно сравнивать между собой разбросы данных, не обращая внимания на абсолютные значения (сигнала или %ингибирования). Полученные из валидационных экспериментах по однородности планшетов **данные о разбросах послужат для вывода критерия качества дальнейших постановок №2.**

Проводя рутинную постановку, мы бы хотели получать ответ на вопрос, насколько ее результаты согласуются с нашим предыдущими опытами, т.е насколько %ингибирования при 10 мкМ MCC950 из постановки соответствует %ингибирования при 10 мкМ из экспериментов по однородности планшетов. Насколько CV из рутинной постановки соответствуют CV из экспериментов по однородности планшетов. Мы бы хотели использовать статистические тесты, но в одной из выборок у нас будет всего лишь одно значение - стат тест не проведем. Можно попытаться представить эту задачу как задачу поиска выбросов - если результат рутинной постановки сильно выбивается из совокупности ранее полученных результатов (из данных по тесту на однородность планшетов), можно считать качество постановки неудовлетворительным и не учитывать ее результаты в дальнейшем.

Существуют разные методы поиска выбросов. Далее рассмотрены некоторые из них

✓ Некоторые методы определения выбросов

Тут перевод кусочка [этой](#) статьи.

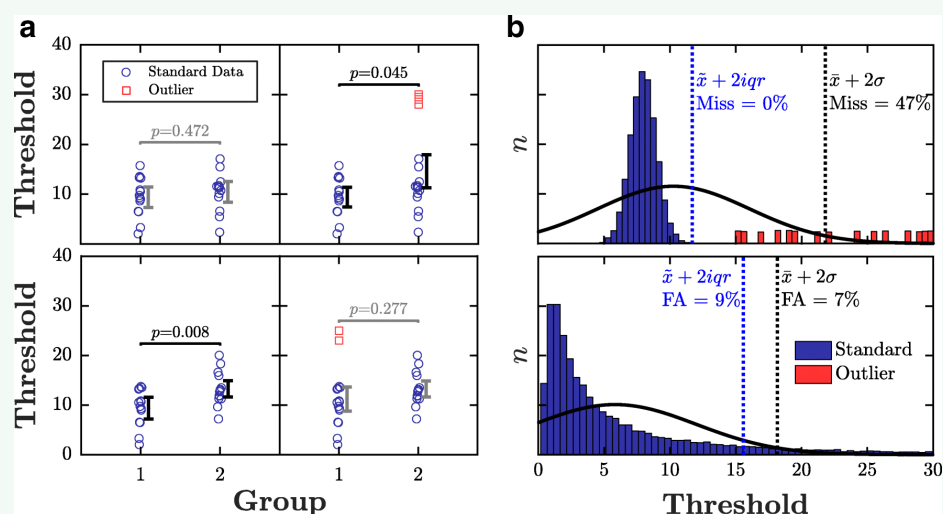


Рис. 1 Пример гипотетических данных, показывающих: **a** как наличие статистических выбросов (красные квадраты) может качественно повлиять на общую картину результатов; **b** общие ошибки, допущенные существующими методами идентификации выбросов, включая промахи (ложноотрицательные) и ложные срабатывания (FA - false alarm, ложноположительные). Значения P на панели **a** относятся к результатам t-тестов.

SD

x_i - выброс, если он находится на λ стандартных отклонений σ дальше от среднего:

$$(\mathit{mathjax-inline}(\mathit{x} > (\overline{\mathit{x}} + \lambda\sigma),)\mathit{mathjax-inline})$$

где λ обычно находится в диапазоне от 2 (либеральный) до 3 (консервативный). Это одна из наиболее часто используемых эвристик, но она имеет существенные недостатки. Среднее значение и σ искажаются экстремальными значениями, что означает, что более далекие выбросы могут «маскировать» меньшие. Это может привести к ложноотрицательным результатам (определение выбросов как подлинных данных; рис. 1b, верхняя панель). Этот метод также предполагает симметрию (т. е. придает одинаковую важность положительным и отрицательным отклонениям от центра). Неправильное допущение симметрии может привести к ложным срабатываниям (определение подлинных данных как выбросов; рис. 1b, нижняя панель). Наконец, хотя SD-эвристика явно не требует, чтобы распределение выборки было распределено по Гауссу, $\pm \lambda\sigma$ может включать больше или меньше данных, чем ожидалось, если данных нет. Например, $\pm 2\sigma$ исключит 5% самых экстремальных значений, когда данные являются Гауссовыми, и вплоть до 25% в противном случае (см. неравенство Чебышева).

rSD

То же, что и SD, но применяется рекурсивно до тех пор, пока не будут обнаружены дополнительные выбросы:

$$(\mathit{mathjax-inline}(\begin{cases} x^i_0 > (\overline{x}_0 + \lambda\sigma_0) \\ x^i_n > (\overline{x}_n + \lambda\sigma_n) \end{cases})\mathit{mathjax-inline})$$

Эта эвристика направлена на решение проблемы маскировки (см. выше) путем постепенного удаления самых экстремальных выбросов. Однако, как и SD, он остается нетерпимым к распределениям, которые не соответствуют предполагаемой гауссовой форме. В ситуациях, когда выборки немногочисленны или искажены, этот подход склонен к агрессивному отклонению больших объемов подлинных данных (см. Рис. 1b). Пользователи обычно пытаются компенсировать это, используя относительно высокий уровень критериев и/или ограничивая количество рекурсий (например, $\lambda \geq 3$, $n_{\max} = 3$).

IQR

x_i - выброс, если он лежит более чем в λ раз больше межквартильного размаха от медианы:

$$(\mathit{mathjax-inline}(\mathit{x} > \{\tilde{x} + \lambda\{iqr\}\})\mathit{mathjax-inline})$$

Это непараметрический аналог SD: среднее и стандартное отклонение заменены на медиану и iqr соответственно. В отличие от SD, ключевая статистика относительно надежна: точки разбивки для i и iqr составляют 50% и 25% (соответственно), что означает, что выбросы могут составлять до 25% данных до того, как расчетные значения начнут искажаться (Rousseeuw & Croux, 1993). Однако, как и SD, метод IQR учитывает только абсолютное отклонение от центра. Поэтому он остается нечувствительным к какой-либо асимметрии в распределении выборки (рис. 1b, внизу).

Процентиль

x_i - выброс, если он лежит выше λ -го процентиля или ниже $(1 - \lambda)$ -го:

$$(\mathit{mathjax-inline}(x_i > P_{\lambda} \quad \text{или} \quad x_i < P_{1-\lambda})\mathit{mathjax-inline})$$

Эта эвристика эффективно «обрезает» данные, отбрасывая самые крайние точки, независимо от их значений. В отличие от IQR, этот подход чувствителен к асимметрии в распределении выборки. Однако в остальном он груб, поскольку игнорирует любую информацию, содержащуюся в разбросе точек данных. Метод процентилей также в значительной степени вызывает вопрос, поскольку экспериментатор должен априори оценить количество наблюдаемых выбросов. Если λ установлено неправильно, подлинные данные могут быть исключены или выбросы могут быть пропущены.

Тьюки

x_i - выброс, если он лежит более чем в λ раз больше iqr от 25-го / 75-го процентиля:

$$(\mathit{mathjax-inline}(x_i > P_{75} + \lambda\{iqr\} \quad \text{или} \quad x_i < P_{25} - \lambda\{iqr\})\mathit{mathjax-inline})$$

Популяризованный известным статистиком Джоном У. Тьюки, этот эвристический подход, также известный как «ящик с усами», пытается объединить лучшие черты IQR и метода процентилей. Информация, содержащаяся в разбросе данных, iqr, сочетается с использованием нижнего и верхнего квартиля, которые обеспечивают некоторую чувствительность к асимметрии.

MAD_n

x_i - выброс, если он находится дальше от медианы, чем λ , умноженное на медианное абсолютное расстояние [MAD] каждой точки от медианы:

$$\left(\frac{x_i - \tilde{x}}{MAD_n} \right) > \lambda, \quad \text{где} \quad MAD_n = \text{med}_{i=1}^n |x_i - \text{med}_{j=1}^n |x_j - x_i|$$

В отличие от других непараметрических методов, описанных ранее, эта эвристика использует MAD, а не iqr в качестве меры разброса. Это делает его более надежным, поскольку статистика MAD имеет наилучшую возможную точку разбивки (50% по сравнению с 25% для iqr). Однако, как и в случае с IQR, MADn предполагает симметрию, учитывая только абсолютное отклонение точек данных от центра. Подробнее [тут](#).

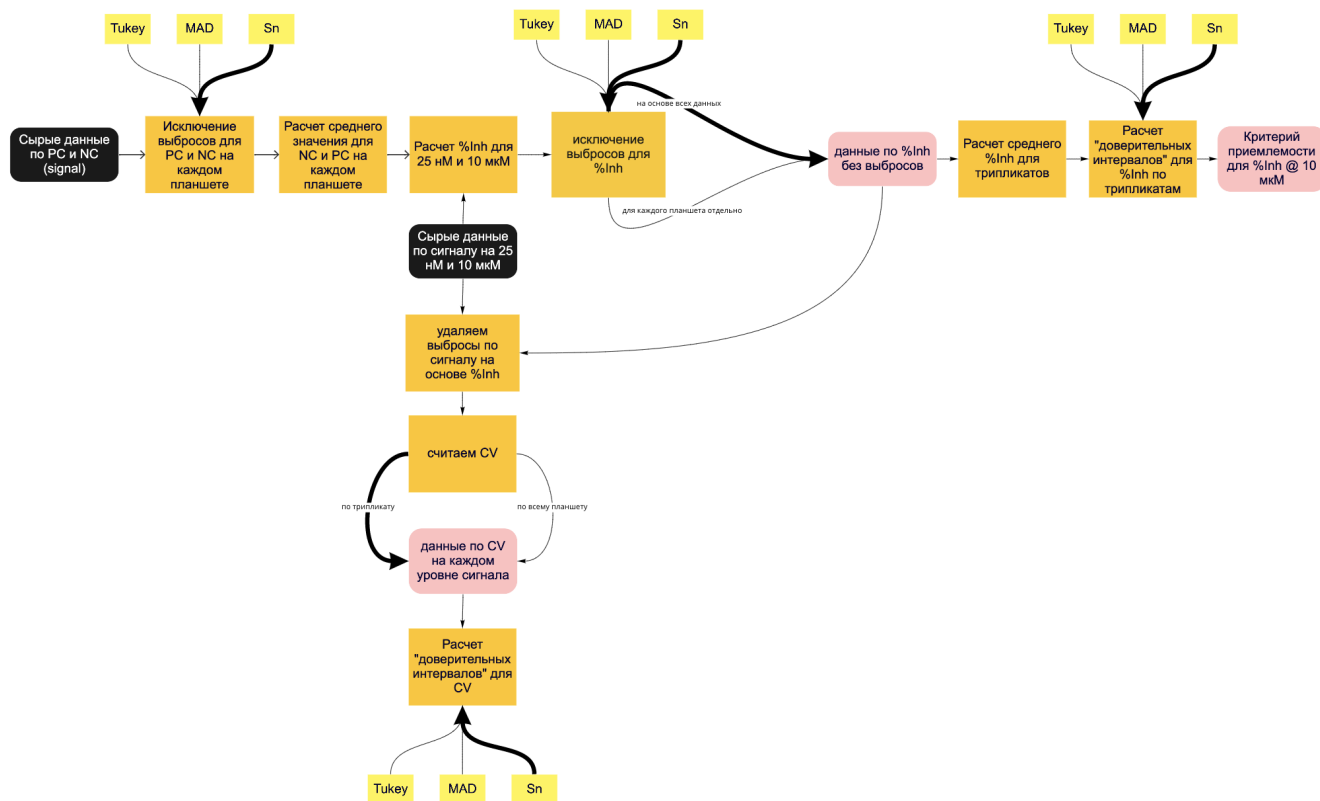
S_n

x_i - выброс, если среднее расстояние x_i от всех других точек больше, чем λ , умноженное на медианное абсолютное расстояние каждой точки от каждой другой точки:

$$\left(\frac{\text{med}_{j \neq i} |x_i - x_j|}{S_n} \right) > \lambda, \quad \text{где} \quad S_n = c_n \text{med}_{i=1}^n \left(\text{med}_{j \neq i} |x_i - x_j| \right)$$

где c_n - коэффициент коррекции смещения для конечных размеров выборки. Введенный [Rousseeuw и Croux \(1993\)](#), S_n как и MAD, является максимально надежной мерой распространения. Однако он отличается от MAD_n тем, что S_n учитывает типичное расстояние между всеми точками данных, а не измеряет, насколько далеко каждая точка находится от некоторого центрального значения. Таким образом, он продолжает обеспечивать достоверную меру разброса, даже если распределение выборки асимметрично. Историческая трудность S_n - его вычислительная сложность. Однако сейчас такой проблемы уже не стоит.

Чтобы вывести критерии приемлемости постановки, мы обработали данные из опытов по однородности планшетов по следующей схеме:



Тонкими стрелками на схеме обозначены возможные пути, жирной линией выделен путь, который мы использовали. Мы делали расчет 3 описанными выше способами (Тьюки ($\lambda = 1.5$), MAD_n ($\lambda = 2.5$), S_n ($\lambda = 3.25$)). Практически во всех случаях на наших данных Тьюки и MAD_n были более "либеральными", чем S_n . Так же, стоит отметить, что в нашем случае Тьюки и MAD_n зачастую давали схожие результаты. Так как мы хотели вывести критерии приемлемости, то мы решили использовать самые "жесткий" критерий отсева выбросов - S_n (оптимально это или нет - вопрос открытый).

Дальше по шагам пройдем по пунктам из нашей схемы:

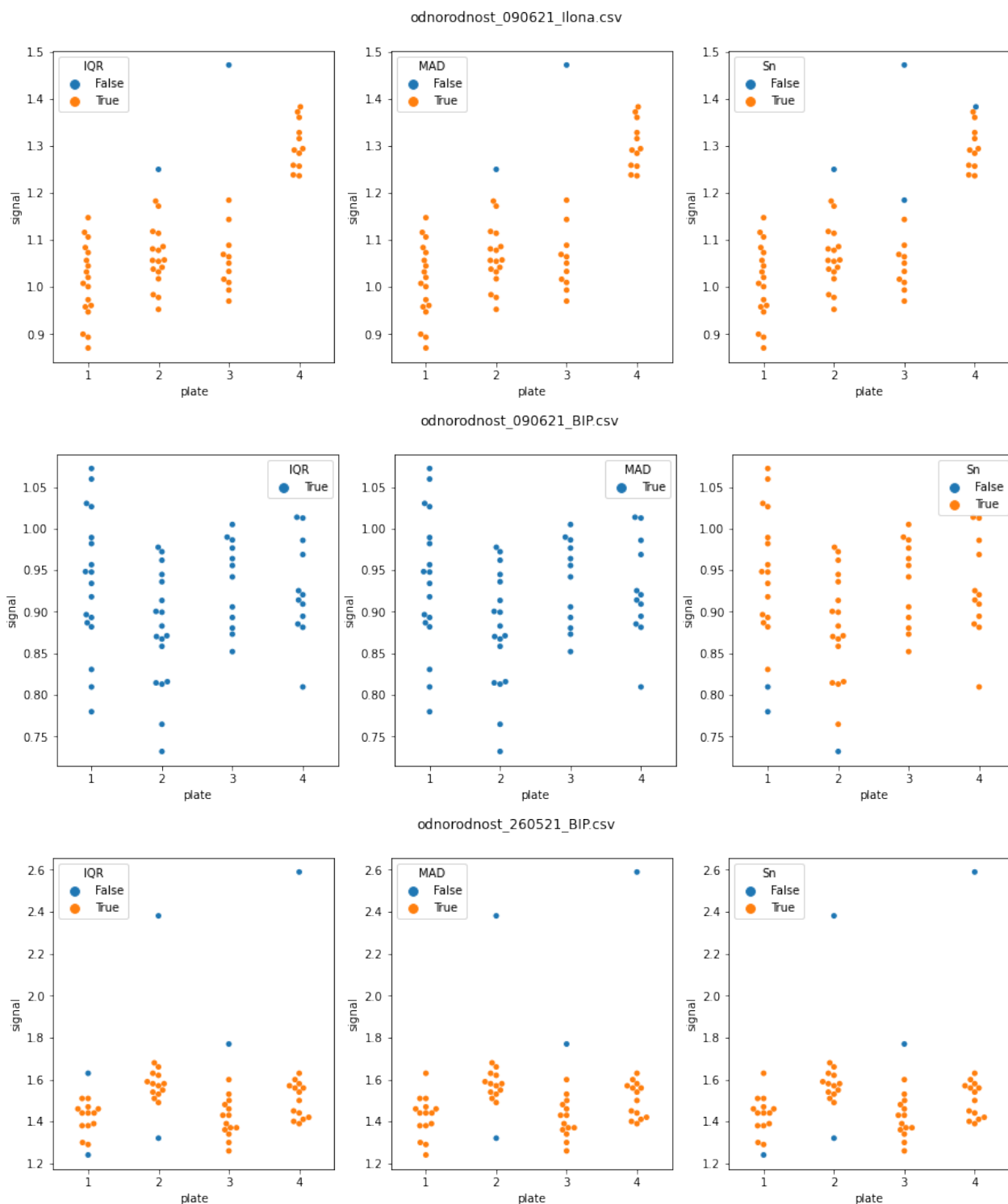
1. Исключение выбросов для РС и NC

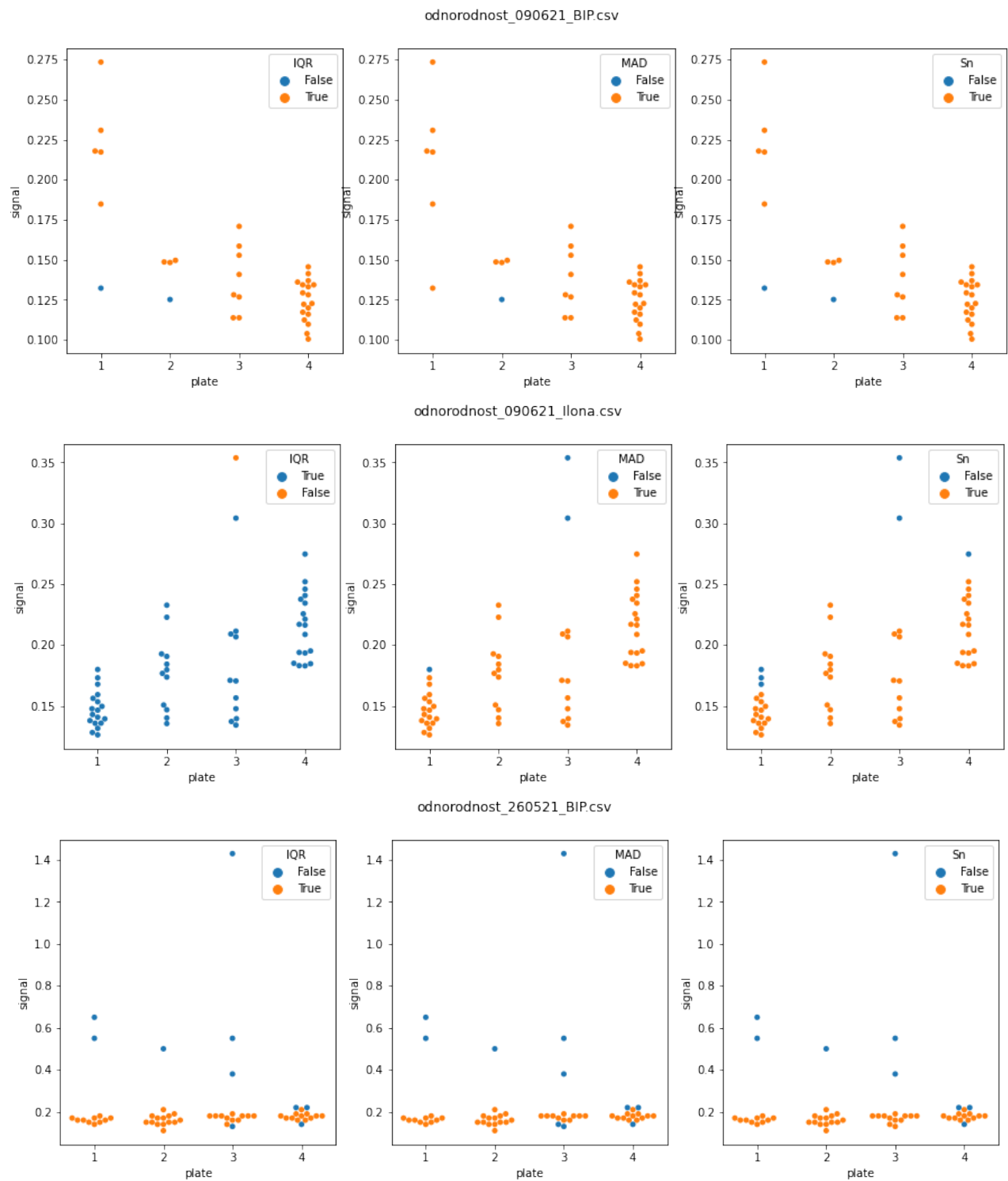
Из нашего опыта известно, что сигнал может колебаться от дня к дню и от планшета к планшету, поэтому чтобы сравнивать результаты, полученные для кандидатов в разные дни, необходимо переводить сигнал в %ингибирования, который мы рассчитываем следующим образом:

$$\%Activity = 100 \times \frac{well_{mid} - AVG_{min}}{AVG_{max} - AVG_{min}} \quad \%Inhibition = 100\% - \%Activity$$

Для этого нам нужно иметь средние по планшету значения сигналов PC и NC (AVG_{max} и AVG_{min} в формуле). Чтобы их получить, сначала необходимо избавиться от выбросов.

Важно! Мы использовали подход Тьюки, но на картинках он подписан как IQR!

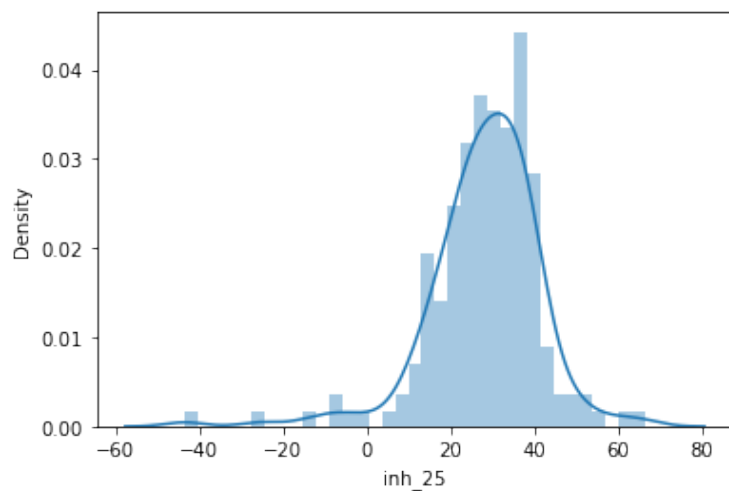
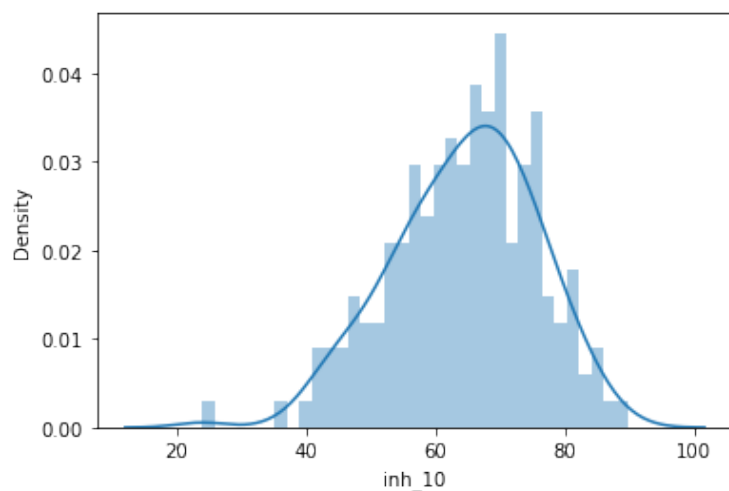




2. Расчет средних значений сигналов PC и NC для каждого планшета

3. Расчет %Inhibition в каждой лунке с 10 мкМ и 25 нМ ингибитора

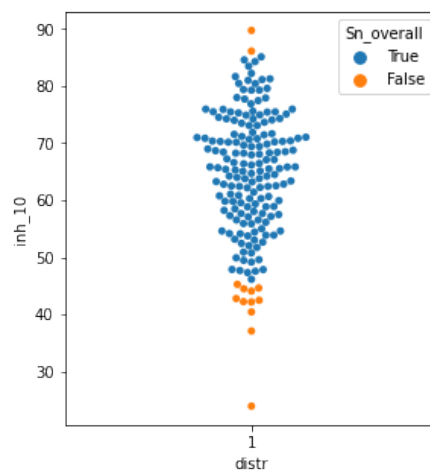
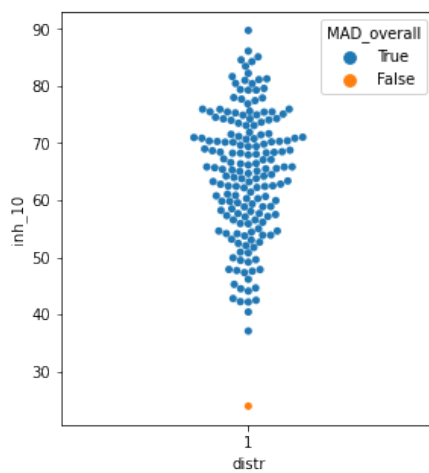
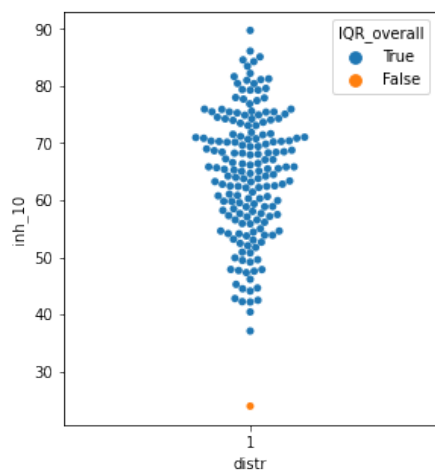
Когда мы перешли к значениям %Inhibition, мы можем смотреть не на результаты на отдельном планшете, а на все результаты вместе. Их распределения выглядят так. Очевидны длинные хвосты в области низких значений.



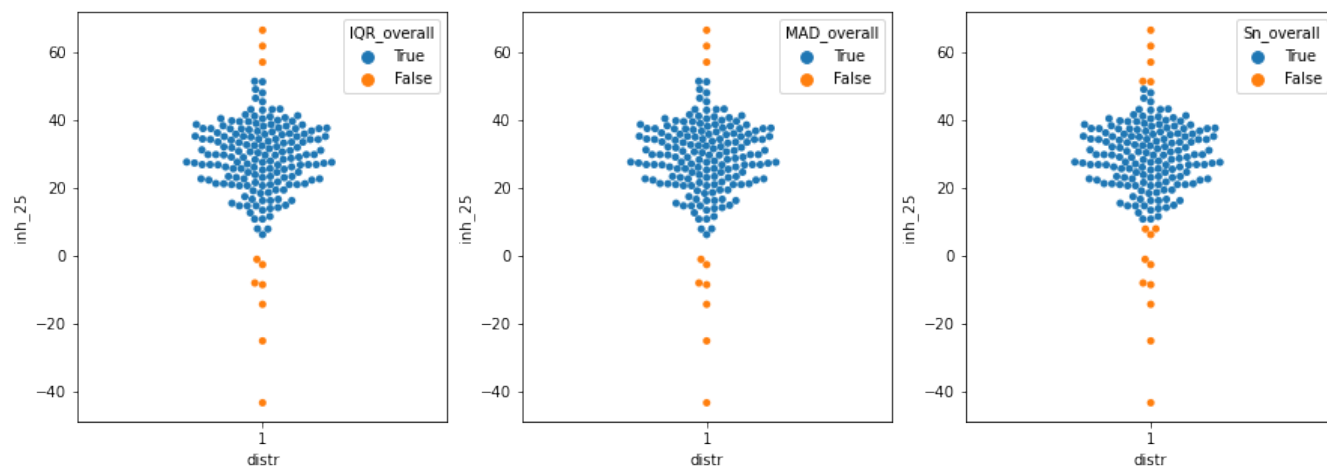
4. Исключение выбросов в %Inh @ 10 мкМ и 25 нМ

Далее на основе всех данных всех экспериментов исключаем выбросы для %Inh на 25 нМ и 10 мкМ

10 мкМ



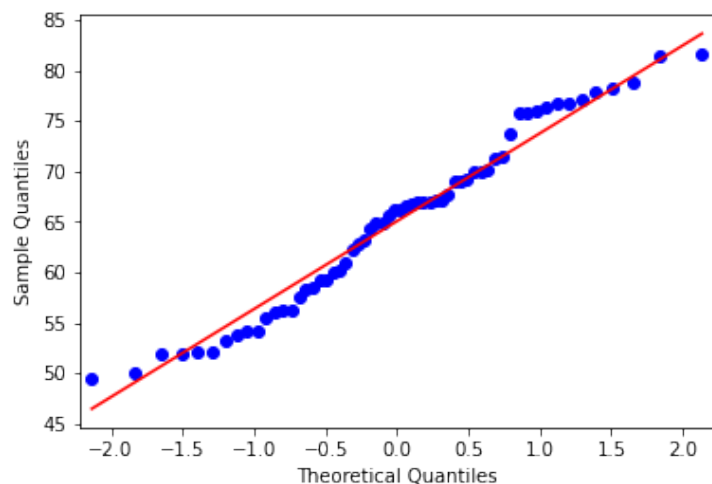
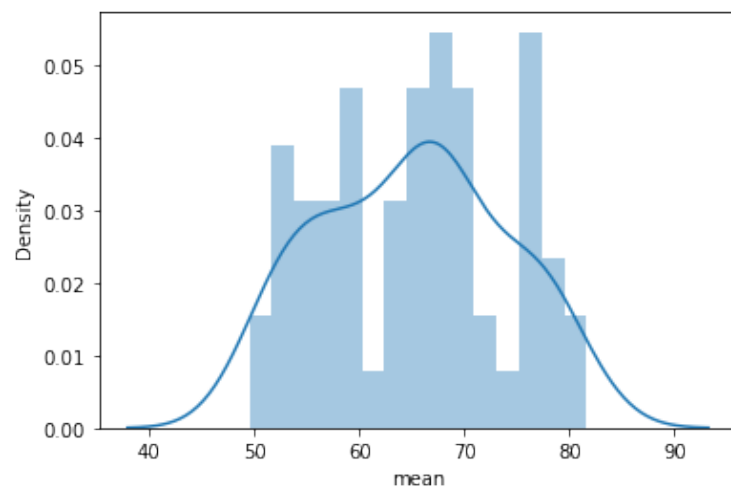
25 нМ



5. Расчет среднего в трипликатах %Inh @ 10 мкМ и 25 нМ

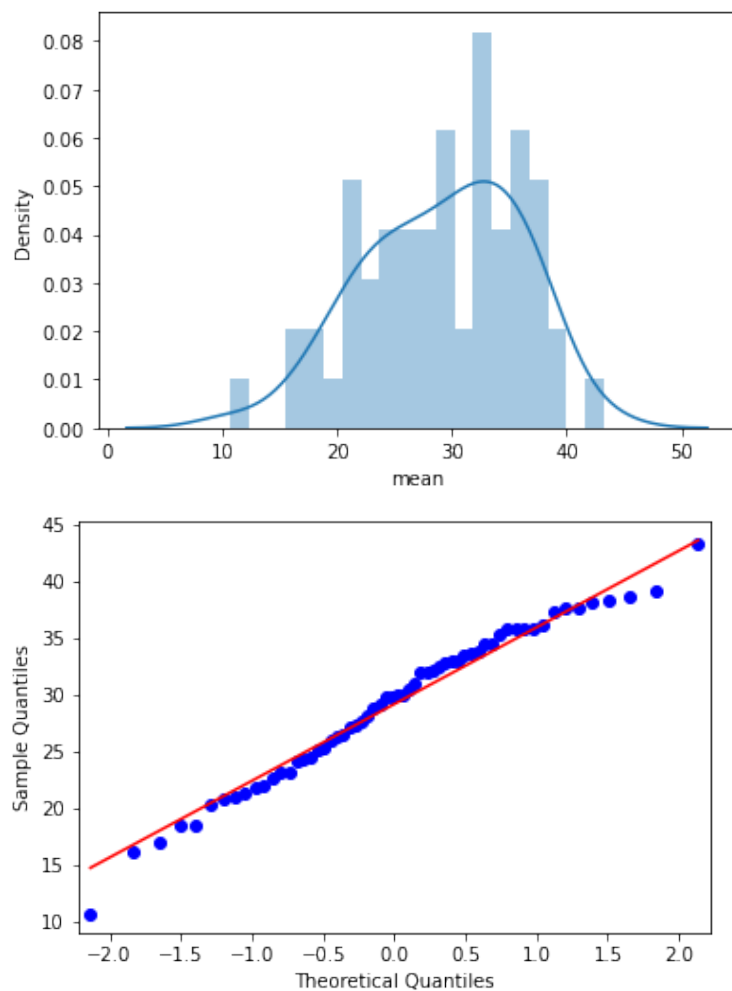
В рутинных постановках мы смотрим не на значения сигнала или %Inh в отдельной лунке, а работаем с усредненными значениями из 3 лунок. Поэтому рассчитаем средний %Inh для трех лунок (каждая лунка учитывается только в расчете одного среднего, лунки объединяются "по столбцам" планшета - так же мы обычно усредняем лунки и в обычном эксперименте) и именно на основе усредненных значений посчитаем, какие значения приемлемы.

Распределение средних значений %ингибирования при 10 мкМ в трипликатах со всех планшетов во всех экспериментов; соответствующие теоретические квантили.



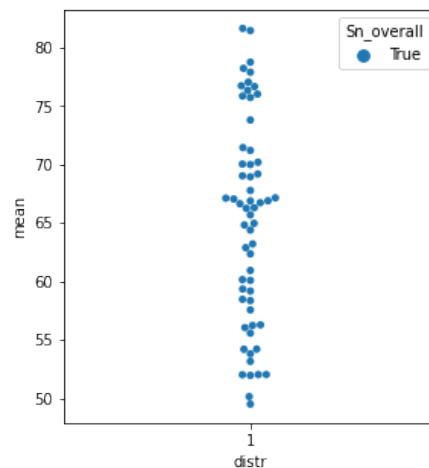
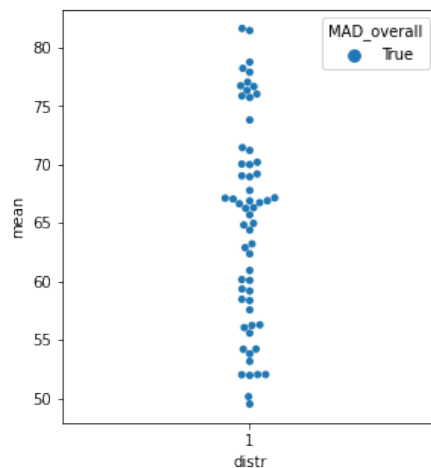
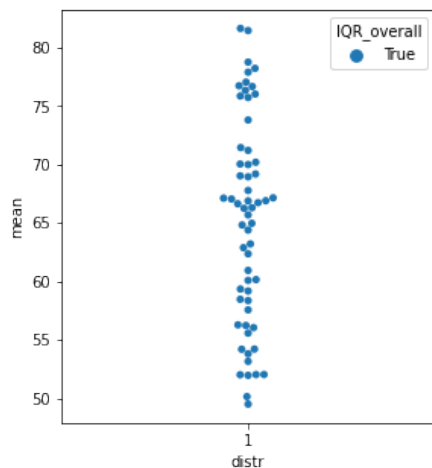
Этот расчет не является необходимым для наших целей. Приведен только для иллюстрации.

Распределение средних значений %ингибирования при 25 нМ в трипликатах со всех планшетов во всех экспериментах; соответствующие теоретические квантили.



6. Расчет выбросов для среднего в трипликатах %Inh

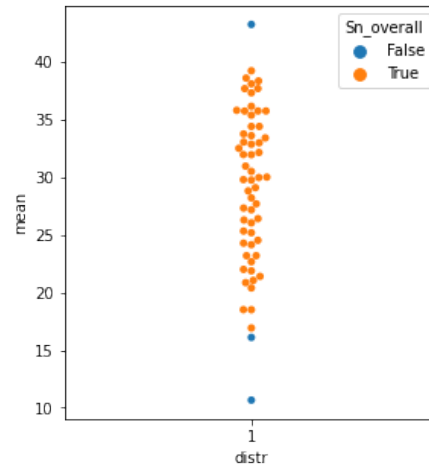
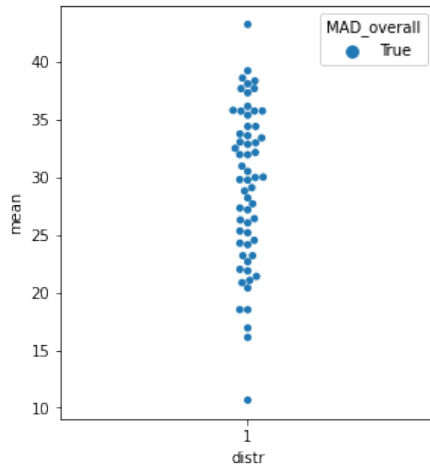
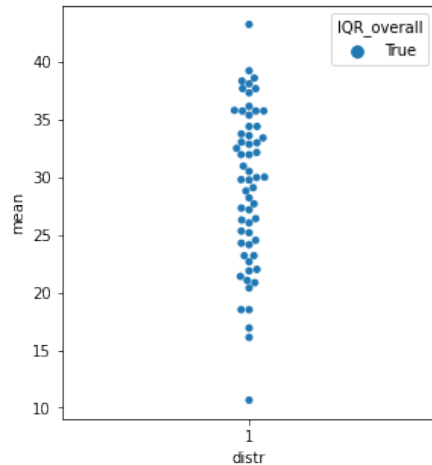
Выбросы средних в трипликатах %Inh @ 10 мкМ



```
count    60.000000
mean     65.076616
std       8.774515
min       49.505115
25%       58.161058
50%       66.275646
75%       70.442487
max       81.633850
```

Ингибирование при 10 мкМ контрольного соединения MCC950 составляет от 49 до 82% в экспериментах по однородности планшетов.

Этот расчет не является необходимым для наших целей. Приведен только для иллюстрации.



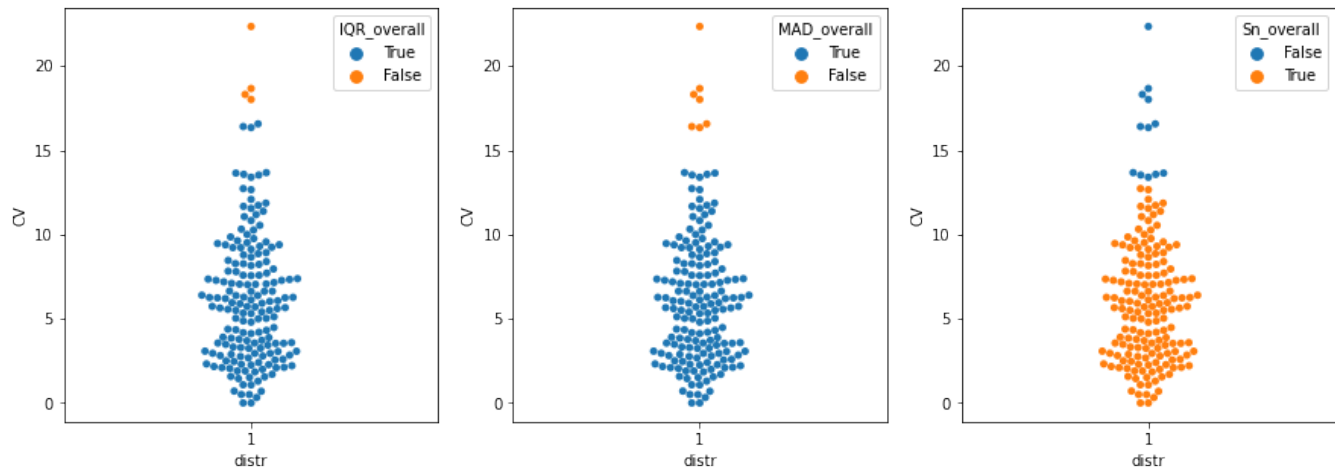
```
count    57.000000
mean     29.477483
std       6.013472
min       16.917122
25%       24.520565
50%       29.966148
75%       34.393211
max       39.223578
```

Ингибирование при 25 нМ контрольного соединения MCC950 составляет от 16 до 39% в экспериментах по однородности планшетов.

7. Расчет выбросов для CV

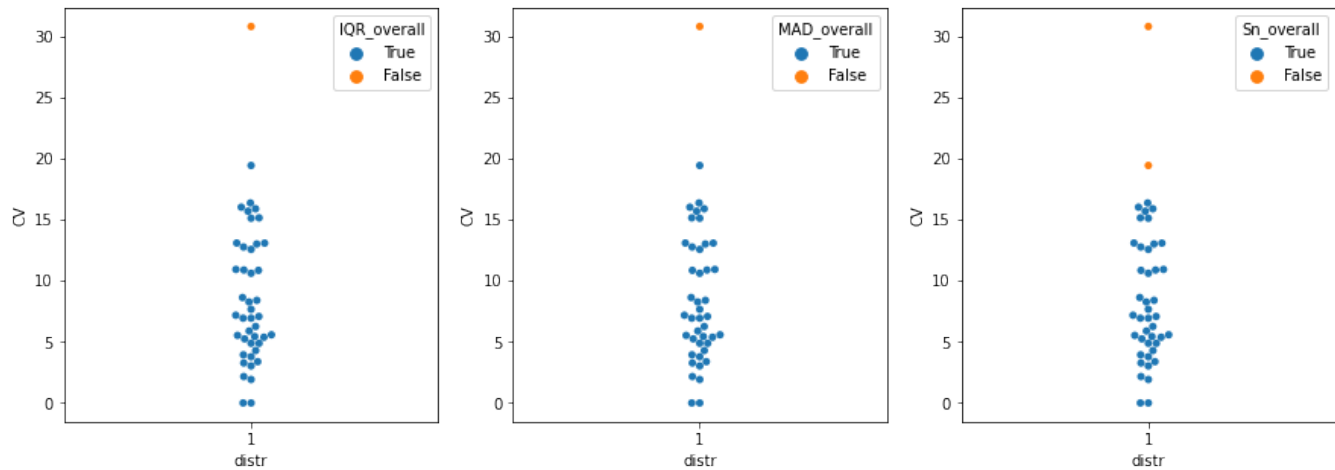
CV мы рассчитываем тоже для триплексов - так же, как мы будем делать в рутинных постановках. Также в рутинных постановках обработку CV мы проводим на "сырых сигналах", поэтому сначала отбросим в данных по сигналу на 10 мкМ и 25 нМ точки, соответствующие выбросам % Inh в точке из пункта 4, а дальше уже рассчитаем CV в триплексах.

CV в триплексе при измерении сигнала в экспериментах по однородности < 13.



count	164.000000
mean	5.575306
std	3.105812
min	0.000000
25%	2.942037
50%	5.579004
75%	7.724310
max	12.720343

Для NC посчитали отдельно - CV в триплексе для таких сигналов в экспериментах по однородности < 16.



count	42.000000
mean	8.042249
std	4.654450
min	0.000000
25%	4.880703
50%	7.004077
75%	12.148908
max	16.355859

8. Сводная таблица по результатам тестов на однородность планшетов

%I _{hh} @10 мкМ МСС950	CV (кроме NC)	CV (NC)
49 - 82%	<13	<16