

УДК 615.036:616-006

РАСЧЕТ КРИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК РАСПРЕДЕЛЕНИЙ ОБЩЕПРИНЯТЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ ТРО И УПЖ И ОЦЕНКА ИХ ЗНАЧИМОСТИ НА ОСНОВЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ ФУНКЦИЙ ПЛОТНОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

В.Н. Алдобаев¹, А.А. Масликов²,
Л.А. Еременко¹, А.А. Мазанова¹

¹«Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов» - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства» (НИЦ ТБП – филиал ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России), 142253, г. Серпухов, Московская обл., Российская Федерация
²Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Университет «Дубна», Филиал «Протвино», 142281, г. Протвино, Московская обл., Российская Федерация

Были точно установлены параметры критических распределений рассчитываемых показателей торможения роста опухоли (ТРО) и увеличения продолжительности жизни (УПЖ), принятых в доклинической практике при оценках противоопухолевого потенциала оригинальных субстанций в экспериментах *in vivo*.

В рамках пакета Mathematica 9 были созданы программные модули, позволяющие оценивать статистическую достоверность показателя ТРО на уровнях 70 % и 90 %, а также показателя УПЖ на уровнях 50 % и 75 %, рассчитывать математическое ожидание и доверительный интервал для показателей ТРО и УПЖ на любом уровне эффекта, проводить сравнение эффективности нескольких препаратов с учётом математических ожиданий и доверительных интервалов, вычисленных для их показателей ТРО и УПЖ в случае близости соответствующих формальных значений, проводить априори тесты на значимость показателей ТРО и УПЖ с учётом основных влияющих факторов: разброса параметров в экспериментальных группах и размеров опытной и контрольной групп.

Ключевые слова: показатель торможения роста опухоли (ТРО), показатель увеличения продолжительности жизни (УПЖ), среднееквадратическое отклонение (СКО), математическое ожидание (МО), доверительный интервал, *t*-распределение Стьюдента, нормальное распределение, интегральная функция распределения, функция плотности распределения.

Введение. Принятые на сегодняшний день критерии оценки эффективности субстанций, обладающих потенциальным противоопухолевым эффектом на стадии доклинических испытаний, определены в Руководстве по проведению доклинических исследований ле-

карственных средств. ч. I, под редакцией д.м.н. Миронова А.Н., 2012 г. В качестве основных рассчитываемых критериев выступают: показатель торможения роста опухоли (ТРО) и показатель увеличения продолжительности жизни (УПЖ). В руководстве приводятся не-

Алдобаев Владимир Николаевич (Aldobaev Vladimir Nikolaevich), к.б.н., начальник отдела аналитической химии и радиобиологии НИЦ ТБП – филиал ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 142253, г. Серпухов, Московская обл., aldobaev@toxicbio.ru

Масликов Александр Альбертович (Maslikov Aleksandr Albertovich), к. физ.-мат. наук, доцент кафедры математики и естественных наук Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московской области «Университет «Дубна», Филиал «Протвино», 142281, г. Протвино, Московская обл., masspref@yandex.ru

Еременко Лариса Алексеевна (Eremenko Larisa Alekseevna), с.н.с. отдела аналитической химии и радиобиологии НИЦ ТБП – филиал ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 142253, г. Серпухов, Московская обл., laeremenko@yandex.ru

Мазанова Анна Александровна (Mazanova Anna Aleksandrovna), с.н.с. отдела аналитической химии и радиобиологии НИЦ ТБП – филиал ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 142253, г. Серпухов, Московская обл., anna-mazanova@rambler.ru

сколько критических величин показателей ТРО и УПЖ, которые свидетельствуют о проявленной минимально необходимой эффективности субстанций на моделях животных опухолестоителей, без учёта статистической достоверности достигнутых показателей.

Данная работа посвящена вопросам установления статистической достоверности показателей ТРО и УПЖ с учётом ряда влияющих факторов, вытекающих из формата экспериментов, описанных в [1], при исследованиях противоопухолевой активности субстанций *in vivo*. Для расчетов был использован программный пакет *Mathematica 9*, Wolfram Research Inc. На сегодняшний день эта компания считается одним из наиболее авторитетных производителей соответствующего программного обеспечения в мире.

Материалы и методы исследования. Конкретно по критериям торможения роста опухоли (ТРО) и увеличению продолжительности жизни (УПЖ) в [1] даны следующие рекомендации.

Соединение нового класса, рекомендуемое для клинического изучения, должно соответствовать одному или более из следующих критериев эффективности:

- торможение роста хотя бы одной солидной опухоли из обязательного к изучению спектра на 90 % и более, сохраняющееся не менее 7 суток после отмены вещества;
- торможение роста не менее трех солидных опухолей или подкожно перевитых лейкозов, упомянутых в обязательном перечне, на 70 % и более с сохранением значимого эффекта не менее 7 суток;
- увеличение продолжительности жизни животных с лейкозом на 75 % и более;
- увеличение продолжительности жизни животных с солидной опухолью на 50 % и более;

Показатель ТРО определяется по формуле $TPO \% = (V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}} \times 100$, где

$V_{\text{контроля}}$ – среднегрупповой объём солидной опухоли в определённый момент времени в контрольной группе животных;

$V_{\text{опыта}}$ – среднегрупповой объём солидной опухоли в определённый момент времени в опытной группе животных.

Показатель УПЖ определяется по формуле $УПЖ \% = (СПЖ_{\text{опыта}} - СПЖ_{\text{контроля}}) / СПЖ_{\text{контроля}} \times 100$,

где:

$СПЖ_{\text{опыта}}$ – среднегрупповая продолжительность жизни животных в опытной группе;

$СПЖ_{\text{контроля}}$ – среднегрупповая продолжительность жизни животных в контрольной группе.

Таким образом, показатель ТРО представляет собой разность единицы и отношения двух приблизительно нормально распределённых слу-

чайных величин, которые характеризуются средневыборочными величинами и их среднеквадратическими отклонениями (СКО) при небольших объёмах выборок (N) обычно в интервале 3-10. Число животных в одной группе в начале эксперимента, по рекомендациям [1] составляет 10.

А показатель УПЖ представляет собой разность отношения двух приблизительно нормально распределённых случайных величин, которые характеризуются средневыборочными величинами и их среднеквадратическими отклонениями (СКО) при фиксированном начальном объёме выборок $N=10$, и единицы.

В связи с вышеизложенным у исследователя возникает потребность установления достоверности критических для разработчиков значений ТРО 70 % и 90 % с учётом таких факторов как разброс измеряемых параметров ($V_{\text{контроля}}$; $V_{\text{опыта}}$) и остаточные объёмы выборок на момент установления ТРО, а также установления достоверности критических для разработчиков значений УПЖ 75 % и 50 % с учётом фактора разброса измеряемых параметров ($СПЖ_{\text{контроля}}$; $СПЖ_{\text{опыта}}$).

Для решения вопроса о достоверности перепишем измеряемые параметры ($V_{\text{контроля}}$; $V_{\text{опыта}}$; $СПЖ_{\text{контроля}}$; $СПЖ_{\text{опыта}}$) в более традиционной математической форме:

$$TPO = \frac{x-y}{x} = 1 - \frac{y}{x} \quad ;$$

$$УПЖ = \frac{y-x}{x} = \frac{y}{x} - 1$$

Очевидно, показатели ТРО и УПЖ – безразмерные величины, которые можно измерять в долях единицы или в процентах. При выполнении исследования наблюдаемые эффекты, связанные со скоростями роста опухолей и смертностью, по сути, являются случайными величинами, а объёмы групп зачастую невелики (не более 10-ти животных). В этом случае представляется оправданным моделировать распределение эффектов x и y t -распределением Стьюдента с функцией плотности распределения вида [2,3]:

$$f(t) = \frac{\Gamma[(n+1)/2] \left(1 + \left(\frac{(t-a)/s}{n}\right)^2\right)^{-(n+1)/2}}{\Gamma[n/2] \sqrt{\pi n} s}$$

где $\Gamma[\dots]$ – гамма функция Эйлера, a – математическое ожидание, n – эффективное число степеней свободы (у нас $n=N$ (объём группы))–1, s – масштабный фактор, который связан со среднеквадратическим отклонением (СКО) по формуле:

$$CKO = s \sqrt{\frac{n}{n-2}}$$

В соответствии с изложенным выше показатель ТРО считают критическим с точки зрения эффективности исследуемой субстанции, если он достоверно проявляется на уровне 70 % или 90 %. Количественно это можно выразить так: если мы строим стандартный 95 %-ый доверительный интервал для указанных ТРО, и его нижняя граница оказывается больше нуля, тогда мы можем считать определённый показатель ТРО значимым.

Понятно, что величины СКО измеряемых параметров в экспериментальных группах определяют σ , МО и ширину доверительного интервала для показателя ТРО. В данной работе был разработан метод определения критических уровней СКО при различных объемах экспериментальных групп, т.е. уровней при которых нижняя граница 95%-го доверительного интервала для показателя ТРО совпадает с нулем. При этом основной задачей являлось корректное нахождение распределения отношения y/x .

Отметим, хотя исходные распределения оцениваемых параметров в опытной и контрольной группах ($f_1(x)$ и $f_2(y)$) являются симметричными, Стьюдентового типа, распределение отношения $f(y/x)$ асимметрично, и соответственно математическое ожидание (МО) $M(y/x)$ не совпадает с серединой доверительного интервала.

Интегральная функция распределения для ТРО – $t=1 - y/x$ имеет вид [2]:

$$F(t) = \int_{-\infty}^0 f_1(x) \left[\int_{-\infty}^{(1-t)x} f_2(y) dy \right] dx + \int_0^{+\infty} f_1(x) \left[\int_{(1-t)x}^{+\infty} f_2(y) dy \right] dx \quad (1)$$

где f_1 и f_2 – плотности распределения знаменателя x и числителя y соответственно. Функция плотности распределения ТРО имеет вид:

$$f(t) = F'(t) = - \int_{-\infty}^0 f_1(x) f_2((1-t)x) x dx + \int_0^{+\infty} f_1(x) f_2((1-t)x) x dx \quad (2)$$

Тогда математическое ожидание ТРО определяется стандартным образом:

$$M(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} t \cdot f(t) dt \neq 1 - M(y) / M(x) \quad (3)$$

где $M(y)$ и $M(x)$ – выборочные средние измеряемых параметров, а также границы доверительного интерва-

ла $[t_p, t_2]$ для ТРО с надежностью $y' = 1 - \alpha$, как решения уравнений:

$$F(t_1) = \alpha / 2, \quad F(t_2) = 1 - (\alpha / 2) \quad (4)$$

Допустим для простоты, СКО в двух группах совпадают (в процентах от соответствующих выборочных групповых средних). Среднее параметра подопытной группы примем за 1. Тогда, учитывая, что ТРО = $1 - y/x$, нас интересует решение по s уравнения:

$$F(s, t = 0) = 0,025 \quad (5)$$

Далее, найденное критическое s следует пересчитать в критическое СКО (для экспериментальных групп) с учетом числа степеней свободы.

Теперь, когда найден масштабный фактор s и (СКО) при котором левый край 95-ти процентного доверительного интервала совпадает с нулем, мы можем, решив при этом s уравнение:

$$F(s, t) = 1 - \frac{0,05}{2} = 0,975 \quad (6)$$

относительно t , мы найдем правый край доверительного интервала t_R (или его ширину).

И наконец из уравнения (3), можно вычислить МО для ТРО, в нашем случае это было реализовано с помощью стандартной функции пакета Mathematica.

Аналогичные выкладки можно проделать для показателя УПЖ. Интегральная функция распределения отношения $t=y/x$ имеет вид:

$$F(t) = \int_{-\infty}^0 f_1(x) \left[\int_{tx}^{+\infty} f_2(y) dy \right] dx + \int_0^{+\infty} f_1(x) \left[\int_0^{tx} f_2(y) dy \right] dx \quad (7)$$

где f_1 и f_2 – плотности распределения знаменателя x и числителя y соответственно. Функция плотности распределения отношения t будет иметь вид:

$$f(t) = F'(t) = - \int_{-\infty}^0 f_1(x) f_2(tx) x dx + \int_0^{+\infty} f_1(x) f_2(tx) x dx \quad (8)$$

Если опять взять СКО в двух группах совпадающим (в процентах от соответствующих МО) и среднее параметра подопытной группы принять за 1, тогда, учитывая, что УПЖ = $y/x - 1$, нас будет интересовать решение по s уравнения:

$$F(s, t = 1) = 0,025 \quad (9)$$

Далее, найденное критическое s следует пересчитать в критическое СКО для экспериментальных групп с учетом числа степеней свободы. Теперь для нахождения правого края tR доверительного 95-ти процентного интервала, нужно зафиксировать s и решить уравнение для сдвинутого на 1 отношения t :

$$F(s, t + 1) = 1 - \frac{0,05}{2} = 0,975 \quad (10)$$

Уравнения (5,6) и (9,10) в среде Mathematica численно решались методом «секущих», который хотя и требует указания 2-х стартовых точек, но вполне устойчив.

Результаты и обсуждение. Результаты серий описанных расчетов приведены в виде таблиц 1-3. В таблице 1 приведены расчеты для критического распределения ТРО: значения критических СКО в предположении равенства (в процентном отношении от среднего) для подопытной и группы контроля, величины МО для ТРО, значения масштабного фактора s и ширина доверительного интервала t_r для нескольких различных объемов тестируемых групп. В последнем столбце таблицы для сравнения приведены аналогичные параметры для нормальных распределений в экспериментальных группах.

При анализе содержимого таблицы 1 просматриваются следующие закономерности:

понижение величины эффекта ТРО с 90 % до 70 % приводит к закономерному уменьшению максимальных разбросов параметров в экспериментальных группах;

увеличение объемов выборок (групп) 4/4→6/6

→9/9 приводит к закономерному снижению СКО и стремлению к величине СКО для генеральной совокупности (последний столбец таблицы);

при взаимном изменении объемов выборок опытной и контрольной групп 9/4, 4/9 наблюдаются отклонения значений СКО от значений ряда 4/4→6/6→9/9, в случае 4/9 значительные;

ширина доверительного интервала ТРО ожидается уменьшается в ряду 4/4→6/6→9/9 и далее к случаю нормального распределения;

при взаимном изменении объемов выборок опытной и контрольной групп 9/4, 4/9 наблюдаются отклонения значений ширины доверительного интервала ТРО от значений ряда 4/4→6/6→9/9, в случае величин эффекта 90 % и 70 % – разнонаправленные.

В плане наблюдения за поведением параметров распределения и с целью сопоставления с представленными выше данными СКО одной из экспериментальных групп увеличивали на 5 % по сравнению с табл. 1 при фиксированных объемах выборок (4/4, 9/9). Результаты представлены в таблице 2.

При анализе содержимого таблицы 2 просматриваются следующие закономерности:

увеличение разброса измеряемого параметра контрольной группе (СКО знаменателя) оказывает более существенное влияние на характеристики критического распределения и СКО параметра опытной группы по сравнению с обратным случаем, особенно это заметно при величине эффекта 70 %;

увеличение разброса измеряемого параметра контрольной группы (СКО знаменателя) оказывает разнонаправленное влияние на ширину до-

Таблица 1

Характеристики критического распределения ТРО и совпадающие СКО в опытной и контрольной группах

	Соотношение размеров выборок опытной и контрольной групп, (y/x)	(4/4)	(6/6)	(9/4)	(4/9)	(9/9)	Нормальное распределение
	СКО (%)	117,27	90,95	83,51	111,86	81,94	70,69
ТРО	МО(ТРО)	90,92	90,5	88,02	93,51	90,13	89,24
90 %	s	0,677	0,704	0,482	0,969	0,71	-
	t_r	1,754	1,748	1,767	1,72	1,741	1,716
	СКО (%)	43,65	37,25	35,85	43,67	35,77	34,81
ТРО	МО(ТРО)	66,74	65,64	67,75	66,39	65,00	64,05
70 %	s	0,252	0,289	0,207	0,378	0,31	-
	t_r	1,03	0,956	0,926	1,021	0,935	0,916

Таблица 2

Характеристики критического распределения ТРО и СКО в одной из экспериментальных групп при увеличении СКО в другой на 5 % по сравнению с соответствующими вариантами в таблице 1

	Варьирование разброса в опытной и контрольной группах	(y/x)		(4/4)	(9/9)
		СКО (%)			
ТРО 90 %	Числитель + 5 %	СКО (%)	числитель	123,14	86,04
			знаменатель	112,53	79,76
		МО(ТРО)	t_R	1,74	1,72
			СКО (%)	числитель	111,13
	Знаменатель + 5 %	СКО (%)	знаменатель	123,14	86,04
			МО(ТРО)	91,24	90,53
		МО(ТРО)	t_R	1,77	1,77
			СКО (%)	числитель	45,83
ТРО 70 %	Числитель + 5 %	СКО (%)	знаменатель	43,17	35,53
			МО(ТРО)	66,77	65,05
		МО(ТРО)	t_R	1,04	0,945
			Знаменатель + 5 %	СКО (%)	числитель
	знаменатель	45,83			37,55
	МО(ТРО)	МО(ТРО)		66,6	64,65
		t_R		0,96	0,857

верительного интервала ТРО в зависимости от величины эффекта, при ТРО 70% наблюдается относительное сужение интервала, при ТРО 90% – соответственно расширение.

В таблице 3 приведены расчеты для критического распределения УПЖ: значения критических СКО в предположении равенства (в процентном отношении от среднего) для подопытной и группы контроля, величины МО для УПЖ, значения масштабного фактора s и ширина доверительного интервала t_R для фиксированного начального объема тестируемых групп (10 животных на группу).

При анализе содержимого таблиц 1 и 3 просматриваются следующие закономерности:

понижение величины эффекта УПЖ с 75% до 50% приводит к закономерному уменьшению максимальных разбросов параметров в экспериментальных группах и существенному сокращению доверительного интервала УПЖ;

сопоставление данных таблиц 1 и 3 позволяет заключить, что при близких величинах эффекта (ТРО 70% и УПЖ 75%) максимальные критические разбросы параметров в экспериментальных

Таблица 3

Характеристики критического распределения УПЖ и СКО в исходных группах

(10,10)	УПЖ 75 %	УПЖ 50 %
СКО (%)	18,7	14
МО(УПЖ)	82,4	53,2
s	0,165	0,123
t_R	2,059	1,25

группах при оценке показателя УПЖ почти в два раза меньше, чем при оценке показателя ТРО, и даже меньше, чем при оценке показателя ТРО по генеральной совокупности;

последнее связано с различием знаков асимметрий у распределений показателей ТРО (положительная) и УПЖ (отрицательная) и с разнонаправленным изменением отношений (t) измеряемых параметров при росте обоих показателей.

Программные модули Mathematica 9, использованные для представленных в статье расчётов, находятся в свободном доступе на сайте ФГБУН НИЦ ТБП ФМБА России в виде 4-х файлов (2 для ТРО и 2 для УПЖ). Первые файлы в каждой паре используются для расчета матожидания параметров и 95%-го доверительного интервала. Исходными являются МО, СКО и объемы обеих групп. Вторые файлы применяются для вычисления критического СКО (в долях от МО) при котором достигается статистическая значимость величины эффекта. Расчеты производятся по объемам групп и величине эффекта. Для тестирования модули можно скачать по прямой ссылке <http://toxicbio.ru/tro.zip> в виде архива вместе с инструкцией по их использованию.

Выводы:

1. В результате проведенных расчётов были точно установлены параметры критических расщеплений рассчитываемых показателей ТРО и УПЖ, принятых в доклинической практике при оценках противоопухолевого потенциала оригинальных субстанций в экспериментах *in vivo*.

2. В рамках пакета Mathematica 9 были созданы программные модули, позволяющие оценивать статистическую достоверность показателя ТРО на уровнях 70 % и 90 %, а также показателя УПЖ на уровнях 50 % и 75 %, рассчитывать

математическое ожидание и доверительный интервал для показателей ТРО и УПЖ на любом уровне эффекта, проводить сравнение эффективности нескольких препаратов с учётом математических ожиданий и доверительных интервалов, вычисленных для их показателей ТРО и УПЖ в случае близости соответствующих формальных значений, проводить *a priori* тесты на значимость показателей ТРО и УПЖ с учётом основных влияющих факторов: разброса параметров в экспериментальных группах и размеров опытной и контрольной групп.

3. Программные модули вместе с инструкцией по их использованию находятся в свободном доступе на сайте ФГБУН НИЦ ТБП ФМБА России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, часть первая. Издание ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России; 2012: 640-654.
2. Гмурман В.Е. Теория вероятностей и математическая статистика: Учебное пособие для вузов. 7-е изд., стереотип. М.: ВШ; 2001.
3. Jackman S. Bayesian Analysis for the Social Sciences, Wiley; 2009: 507.

REFERENCES:

1. Guidelines for pre-clinical studies of medicines, part one. Publication FGBI «SCEMA» Russian Health Ministry; 2012: 640-654.
2. Gmurman V.E. Probability theory and mathematical statistics: A manual for schools. 7th ed., standard. M.: HS; 2001.
3. Jackman S. Bayesian Analysis for the Social Sciences, Wiley; 2009: 507.

V.N. Aldobaev¹, A.A. Maslikov², L.A. Eremenko¹, A.A. Mazanova¹

CRITICAL CHARACTERISTICS CALCULATIONS OF THE DISTRIBUTIONS OF ANTICANCER THERAPY CONVENTIONAL INDICATORS OF MEDIAN SURVIVAL, TUMOR GROWTH INHIBITION) AND EVALUATION OF THEIR SIGNIFICANCE BASED ON THE PROBABILITY DISTRIBUTION DENSITY FUNCTIONS MODELING

¹Research Center for Toxicology and Hygiene Regulation of Bio preparations" – affiliated to the National Research Center «Institute of Immunology», Federal Medical-Biological Agency of Russia, 142253 Serpukhov, Moscow region, Russian Federation

²«Dubna University», Protvino Branch, 142281, Protvino, Moscow region. Russia Federation.

Critical parameters of the distributions rates of inhibition of tumor growth (ITG) indices and increasing median survival (IMS), which are adopted in pre-clinical practice for evaluation of the anticancer potential of original substances were accurately ascertained in experiments *in vivo*. Under the package Mathematica 9, software modules were created which allowed to assess the statistical reliability of the ITG indicator at the levels of 70% and 90 %, and the IMS rate at the levels of 50 % and 75 %, to calculate the mathematical expectation and confidence intervals for ITG and IMS indicators at any level of the effect, to compare the effectiveness of several drugs based on mathematical expectations and confidence intervals calculated for their ITG and IMS indicators in case of close location of the corresponding formal values, and carry out *a priori* tests on the significance of ITG and IMS taking into account the main influencing factors: variation of parameters in experimental groups and size of experimental and control groups.

Keywords: rate of inhibition of tumor growth (ITG), rate of increase in lifespan (median survival), standard deviation (SD), expectation (ME), confidence intervals, t-student distribution, normal distribution, cumulative distribution function, probability density function.

Материал поступил в редакцию 11.04.2016 г.