

2.3.12.0 СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

В общей фармакопейной статье изложены основные методы статистической обработки результатов биологических испытаний лекарственных средств. Могут быть использованы альтернативные методы расчета при обосновании.

Для обработки результатов биологических испытаний возможно применение электронных таблиц, а также подходящего статистического, в том числе биостатистического программного обеспечения (CombiStats, PLA или аналогичные).

1. УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

В разделе приведены используемые в общей фармакопейной статье символы. Если в тексте используется символ, не приведённый в этом разделе, или символ используется в другом значении, то его определение приводится в соответствующей части текста.

- a – свободный член линейной регрессии;
- b – угловой коэффициент линейной регрессии (тангенс угла наклона линии зависимости величины ответа экспериментальной единицы от дозы или её логарифма);
- d – число доз для каждого образца (в модели угловых коэффициентов – число доз для каждого образца, исключая контроль);
- e – основание натурального логарифма;
- g – статистика, применяемая в теореме Филлера: $g = \frac{c-1}{c}$;
- f, df – число степеней свободы;
- h – число образцов в испытании, включая стандартный образец;
- k – число образцов в испытании, включая стандартный образец, умноженное на число доз в испытании;
- m – оценка активности в общих линейных моделях;
- n – число ответов в группе;
- r – число объектов с положительным ответом на введение дозы в испытаниях, основанных на качественных ответах;

p	–	уровень значимости или отношение r/n для пробит-метода;
s	–	оценка среднеквадратического отклонения ($=\sqrt{s^2}$);
s^2	–	оценка остаточной дисперсии (квадрат среднеквадратической ошибки) в дисперсионном анализе;
t	–	критерий Стьюдента, t-критерий (Таблица 67);
u	–	ответ экспериментальной единицы при использовании 4-х параметрической модели анализа;
x	–	логарифм дозы;
y	–	ответ экспериментальной единицы или преобразованный ответ экспериментальной единицы;
\bar{y}_s, \bar{y}_u	–	средний ответ на стандартный образец и испытуемый образец;
χ^2	–	значение критерия хи-квадрат (Таблица 70);
A_u, A_T, A_v, \dots	–	ожидаемая активность испытуемого образца;
C	–	статистика, применяемая для вычисления доверительных интервалов: $C = \frac{1}{1-g}$;
C_1, \dots, C_n	–	сумма ответов в каждом столбце при использовании дизайна латинского квадрата (Таблица 9) или средний ответ в каждом столбце при использовании дизайна латинского квадрата (Таблица 4);
D_I и D_{II}	–	средний ответ в первый и второй день при использовании перекрестной схемы;
F	–	значение критерия Фишера (отношение оценки большей дисперсии к оценке меньшей дисперсии, таблица 66);
G_s, G_u, \dots	–	коэффициенты постановки в дисперсионном анализе для модели угловых коэффициентов;
H_p, H_L	–	множители в дисперсионном анализе для модели параллельных линий;
H_B, H_I	–	множители в дисперсионном анализе для модели угловых коэффициентов;

I	–	логарифм соотношения доз для модели параллельных линий или шаг между соседними дозами для модели угловых коэффициентов;
J_S, J_U, \dots	–	статистики в дисперсионном анализе, используемые для модели угловых коэффициентов;
SS_i	–	сумма квадратов, обусловленных источником дисперсии i' ;
K	–	поправочный коэффициент в дисперсионном анализе, используемый для вычисления суммы квадратов;
B	–	средний ответ контрольной группы в модели угловых коэффициентов;
L	–	разность логарифмов верхней и нижней доверительной границы активности;
L_S, L_U, \dots	–	линейные контрасты стандартного образца и испытуемого образца;
N	–	общее число ответов в испытании;
$\hat{R}_U, \hat{R}_T, \hat{R}_V, \dots$	–	отношение рассчитанной активности испытуемого образца к значению заявленной активности испытуемого образца;
R_1, \dots, R_n	–	сумма ответов в каждом блоке при использовании дизайна рандомизированных блоков, сумма ответов в каждой строке при использовании дизайна латинского квадрата (Таблица 9) или средний ответ в каждом блоке при использовании дизайна рандомизированных блоков, средний ответ в каждой строке при использовании дизайна латинского квадрата (Таблица 4);
R_U, R_T, R_V, \dots	–	оценка активности испытуемого образца;
S	–	стандартный образец или сумма всех ответов на стандартный образец;
S_1, \dots, S_d	–	сумма ответов на каждую дозу стандартного образца или средний ответ на каждую дозу стандартного образца;
T, U, V, \dots	–	испытуемый образец или сумма всех ответов на испытуемый образец;
U_1, \dots, U_d	–	сумма ответов на каждую дозу испытуемого образца или средний ответ на каждую дозу испытуемого образца;

π	–	3,141592653589793238...;
Φ	–	значение функции кумулятивного стандартного нормального распределения (Таблица 69);
w, W	–	весовой коэффициент;
V	–	коэффициент дисперсии для вычисления доверительных границ.

2. ВВЕДЕНИЕ

Исторически биологическим испытанием называли испытание, при котором количественно определяют ответ живого объекта (клеток, тканей, животных), например, на введение лекарственного препарата или токсина. Результатом проведения биологического испытания является количественная оценка биологической активности. Биологическая активность определяет особую способность или свойство лекарственного средства производить определённый биологический эффект.

При определении биологической активности в подавляющем большинстве случаев используют стандартный образец. Такое сравнение основано на фундаментальном предположении, что определённые количества испытуемого образца и стандартного образца вызывают одинаковый ответ, который может быть установлен количественно. Испытания стандартного образца и испытуемого образца проводят в идентичных условиях. Стандартный образец должен быть предназначен для определения активности.

В некоторых случаях биологическую активность оценивают без применения стандартного образца, например, при косвенном определении эффективных доз (Пример 11).

Существуют и другие методы количественного определения активности, например, иммунологический анализ, метод полимеразной цепной реакции, анализ ферментных реакций. Данные методы основаны на тех же принципах разработки и анализа, и используют те же статистические подходы для обработки наблюдаемых ответов, что и биологические испытания. Таким образом, в рамках ОФС оба типа методов количественного определения активности будут обозначены термином «биологические испытания».

Оценка доверительного интервала активности показывает прецизионность, с которой было проведено испытание. Доверительный интервал активности рассчитывают исходя из дизайна эксперимента и объёма выборки. При количественных определениях

биологическими методами обычно выбирают 95 % доверительный интервал. Для подтверждения того, что истинное значение активности находится в данном интервале с вероятностью 95 %, расчёт границ доверительного интервала проводят статистическими методами.

Термины «среднее арифметическое значение» (далее – среднее значение) и «стандартное отклонение» используются в соответствии с их определением в большинстве руководств по статистике.

Термины «заявленная активность», «аттестованная (сертифицированная) активность», «предполагаемая активность», «отношение активностей» и «рассчитанная активность» используются в данной общей фармакопейной статье для обозначения следующих понятий:

– «заявленная активность»: для готового лекарственного препарата – активность, указанная в маркировке; для исходного (нерасфасованного) материала – активность, установленная производителем;

– «аттестованная (сертифицированная) активность» – активность стандартного образца, указанная в сопроводительной документации;

– «предполагаемая активность» – предварительно установленная активность испытуемого образца, на основании которой рассчитывают дозы, которые были бы эквипотенциальны дозам испытуемого стандартного образца (т. е. рассчитанные дозы испытуемого образца должны обладать активностью, равной дозам стандартного образца);

– «отношение активностей» для испытуемого образца – отношение доз стандартного образца и испытуемого образца, обладающих равной активностью, в условиях проведения испытаний.

– «рассчитанная активность» – активность, вычисленная на основании данных количественного анализа.

3. РАНДОМИЗАЦИЯ И НЕЗАВИСИМОСТЬ ИСПЫТАНИЙ

При проведении биологических испытаний необходимо учитывать множество факторов, которые могут влиять на результаты испытания: время суток, вес и(или) зрелость животного, используемый анестетик, компоненты буфера (реактивы), температуру и положение инкубационной ванны, жизнеспособность клеток и т. д. Биологические испытания должны быть организованы таким образом, чтобы минимизировать их вариабельность. Используемые для этого подходы, например, рандомизация, должны соответствовать цели испытания (*разделы 4.2.1 – 4.2.4*). Рандомизация (случайность)

уменьшает системную ошибку отбора и смещение распределения. С помощью анализа данных, полученных при проведении рутинных испытаний с применением рандомизации, при необходимости, можно оценить эффекты расположения и последовательности.

Основной подход при выполнении биологических испытаний заключается в сравнении зависимостей «доза-ответ» стандартного образца и испытуемого образца, полученных в одном испытании. В таком случае вместо оценок дисперсий внутри процедуры испытания опираются на оценки дисперсий между процедурами испытания и большую часть биологических источников дисперсии, связанных со временем, пространством, реагентами, условиями окружающей среды и различиями между группами организмов, можно отделить от интересующих сравнений. Данный подход можно использовать и внутри процедуры, например, рассматривая использование каждого из планшетов в рамках испытания как отдельного блока. Это позволяет сосредоточить внимание на факторах, которые вызывают межблочные различия, и может ускорить разработку биологического испытания.

Введение (внесение) испытуемых образцов и стандартных образцов должно быть распределено между различными экспериментальными единицами (животными, пробирками и т. д.) строго случайным образом. Любой выбор экспериментальных условий, который преднамеренно не учитывают в плане эксперимента, также должен быть выполнен случайным образом. При составлении групп следует обеспечивать однородность экспериментальных объектов по полу, возрасту, массе тела, происхождению, условиям содержания и т. д. Подходящее распределение экспериментальных объектов по группам также должно достигаться при помощи рандомизации. Рандомизация может быть достигнута при помощи генератора случайных чисел. Каждый раз необходимо убедиться, что генерируется новая последовательность случайных чисел.

Образцы, назначаемые каждому экспериментальному объекту, должны быть настолько независимы, насколько возможно. Без выполнения данного условия вариабельность, свойственная образцу, не будет полностью представлена в дисперсии ошибки эксперимента. В результате будет недооценена остаточная дисперсия, что может привести к:

- 1) необоснованному ужесточению критерия при дисперсионном анализе;
- 2) недооценке истинных доверительных интервалов при испытании, которые рассчитаны исходя из оценки s^2 (ошибка среднеквадратической разности).

Значения двух переменных или двух измерений независимы друг от друга, если они не связаны каким-либо общим фактором. Примерами зависимых переменных являются аликвоты из одного и того же разведения, клетки, аликвотированные из общего пула,

серийные разведения и т.д. Измерения, проведённые на одних и тех же планшетах, также зависимы, так как они более схожи, чем измерения, проведённые на других планшетах. Использование многоканальной пипетки также приводит к появлению зависимых измерений.

Биологические испытания можно считать независимыми, если результаты наблюдений одного из них никак не зависят от результатов другого. Например, испытания, проведённые в последовательные дни с использованием одного и того же разведения стандартного образца, не являются независимыми. Если дизайн эксперимента приводит к появлению зависимых переменных, целью анализа является включение отсутствия независимости в статистическую модель.

4. ИСПЫТАНИЯ, ОСНОВАННЫЕ НА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ОТВЕТАХ

4.1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Количественные данные (ответы) поддаются непосредственному измерению или счёту и могут принимать любое значение в определённом диапазоне.

Для того чтобы в модели достигнуть хорошо выраженного эффекта разведения, следует преобразовать зависимость «доза-ответ» в линейную функцию в наибольшем возможном диапазоне доз. В качестве модели для рассматриваемых количественных определений активности интерес представляют две модели: модель параллельных линий и модель угловых коэффициентов.

При разработке методики количественного определения необходимо убедиться, что полученные данные от множества различных количественных определений соответствуют следующим теоретическим условиям:

1. различные воздействия на экспериментальные объекты были выполнены случайным образом (раздел 3. *Рандомизация и независимость испытаний*);

2. ответы после каждого воздействия должны быть нормально распределены. Незначительные отклонения от этого предположения в основном не сильно влияют на результаты анализа, в случае если испытание включает несколько повторений. Проверку нормального распределения можно проводить с помощью критерия Колмогорова-Смирнова, W-критерия Шапиро-Уилка или гистограмм с наложением кривой нормального распределения, или нормальных вероятностных графиков (по оси абсцисс – наблюдаемое значение, по оси ординат – ожидаемое нормальное значение).

3. стандартные отклонения ответов в каждой группе, как для стандартного образца, так и для испытуемого образца статистически значимо не отличаются друг от друга. Для

проверки однородности дисперсий могут быть использованы критерий Бартлетта, критерий Кохрена и др.

Если условия 2 и (или) 3 не выполняются, то преобразование результатов может привести к выполнению этих условий. Примерами таких преобразований являются логарифмическое (натуральный логарифм, $\ln(y)$) и квадратичное (\sqrt{y} , y^2).

– Логарифмическое преобразование значений y в $\ln(y)$, может выполняться, если однородность дисперсий неудовлетворительна. Оно также может привести к нормальности распределения, если оно было смещено вправо.

– Преобразование y в \sqrt{y} можно использовать в случае, если результаты подчиняются распределению Пуассона, то есть если они получены путём подсчёта числа событий.

– Преобразование y в y^2 может быть использовано, если, например, доза в большей мере пропорциональна площади ингибирования зоны роста микроорганизмов, чем измеренному диаметру этой зоны роста.

При рутинном проведении количественного определения практически отсутствует возможность систематически контролировать выполнение условий 1–3, так как ограниченное число измерений в каждом анализе может отрицательно влиять на чувствительность статистических тестов. Однако при симметричных сбалансированных испытаниях небольшие отклонения от однородности дисперсий и нормальности распределения не оказывают существенного влияния на результаты количественного определения. Вопрос о применимости статистической модели следует ставить под сомнение только в том случае, если ряд полученных результатов испытаний имеет сомнительную валидность. При этом может возникнуть необходимость выполнить новую серию описанных предварительных испытаний.

В зависимости от применяемой статистической модели необходимо контролировать выполнение двух дополнительных условий.

Для модели параллельных линий:

4А) отношение между логарифмом дозы и регистрируемым ответом может быть представлено в виде прямой линии во всем диапазоне исследованных доз;

5А) при анализе прямая линия для любого испытуемого образца параллельна соответствующей прямой линии для стандартного образца.

Для модели угловых коэффициентов:

4В) во всем диапазоне исследованных доз отношение между дозой и полученным ответом для каждого образца может быть представлено в виде прямой линии;

5B) для любого испытуемого образца прямая линия пересекает ось y (при дозе, равной нулю) в той же точке, что и прямая линия для стандартного образца.

Условия 4A и 4B могут быть подтверждены при количественных определениях, в которых использовано как минимум по три разведения для каждого образца. Использование результатов количественного определения, полученных при одном или двух разведениях, может быть обосновано лишь в том случае, если накопленный опыт свидетельствует, что условия линейности, параллельности или совпадения точек пересечения всегда выполняются.

Если хотя бы одно из перечисленных пяти условий (1, 2, 3, 4A, 5A или 1, 2, 3, 4B, 5B) не выполняется, применение приведённых в данном разделе методов вычисления не может быть обосновано и следует провести специальный анализ результатов количественного определения. Другой метод преобразования не должен применяться до тех пор, пока не будет доказано, что невыполнение условий является не случайным, а обусловлено систематическим изменением условий испытания. В этом случае, прежде чем принять новое преобразование для рутинных количественных определений, следует повторить исследования, описанные для условий 1 – 3.

В рамках однократного количественного определения не всегда можно принять во внимание все возможные источники дисперсии (например, внутрилабораторная дисперсия в серии «изо дня в день»). В этом случае доверительные интервалы повторных результатов количественных определений одного и того же образца могут не совпадать, и следует соблюдать осторожность при оценке отдельных доверительных интервалов. Для получения более надёжной оценки доверительного интервала необходимо выполнить несколько независимых количественных определений, объединить полученные результаты и получить одну оценку активности и один доверительный интервал (см. раздел *б. Объединение результатов независимых количественных определений*).

Для простоты вычислений и улучшения прецизионности анализа при планировании эксперимента обычно учитывают следующие ограничения:

А) Каждый из образцов должен быть испытан с применением одинакового количества доз.

Б) В модели параллельных линий отношение соседних доз должно быть постоянным; в модели угловых коэффициентов интервал между соседними дозами должен быть постоянным.

В) Для каждой постановки должно быть одинаковое количество экспериментальных единиц.

На рисунке 1 представлены рассмотренные примеры статистической обработки результатов биологических испытаний.

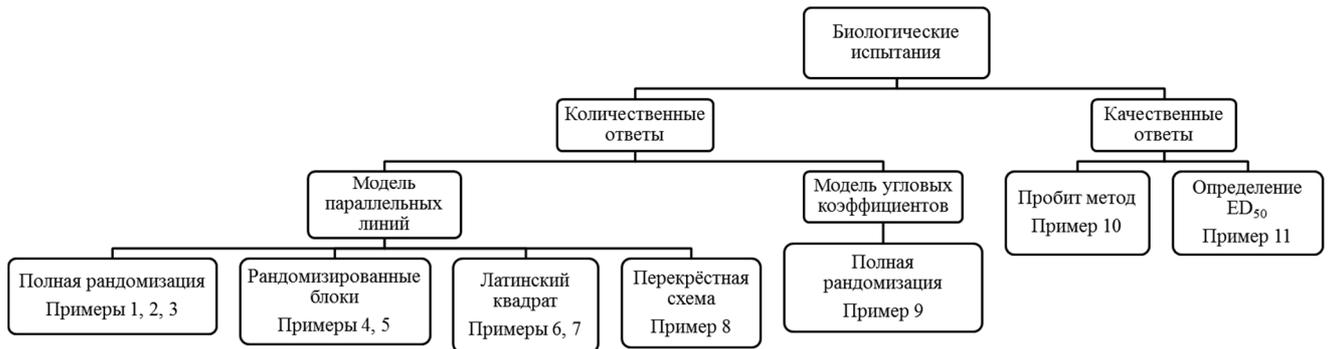


Рисунок 1. – Примеры статистической обработки результатов биологических испытаний.

4.2. МОДЕЛЬ ПАРАЛЛЕЛЬНЫХ ЛИНИЙ

Для определения активности наиболее часто применяют модель параллельных линий. Она основана на том, что в подавляющем большинстве случаев в интервале обычно применяемых доз ответ, когда он выражен количественно, связан линейно с логарифмом дозы. Эту связь отражает уравнение линейной регрессии:

$$y=a+bx$$

Определение активности проводят путём сравнения линий дозозависимости стандартного образца и испытуемого образца. Графически «истинное» значение активности испытуемого образца можно выразить через горизонтальное расстояние между линиями дозозависимости по оси x – рисунок 2.

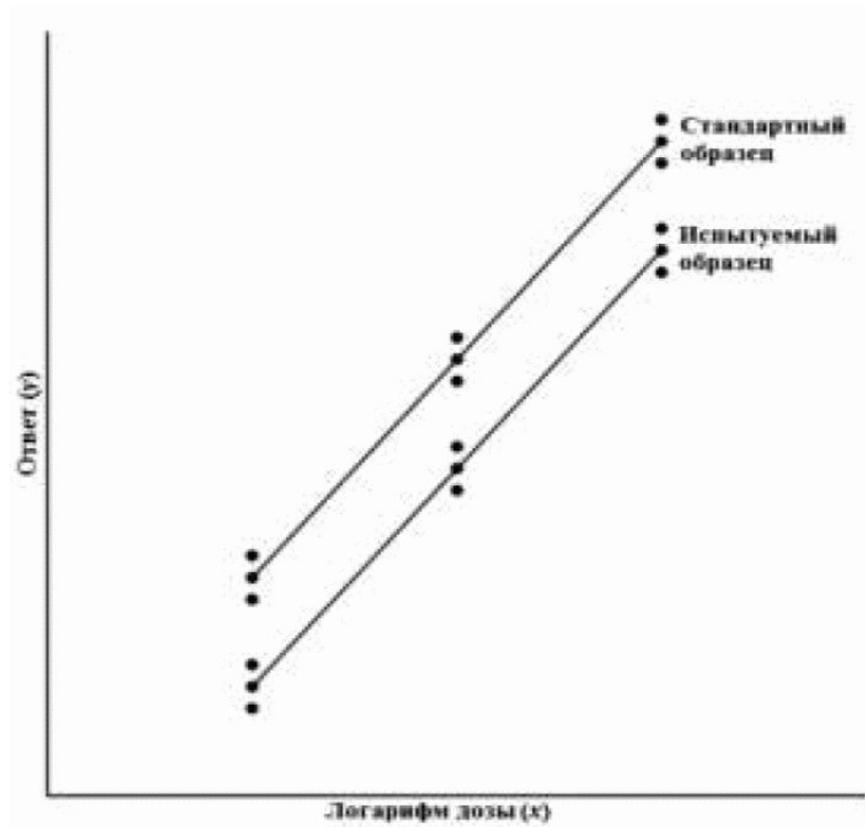


Рисунок 2. – Модель параллельных линий (пример для трех доз в трех повторах).

Чем больше расстояние между линиями, тем менее точен прогноз в отношении предполагаемой активности испытуемого образца. Если линия, соответствующая испытуемому образцу, смещена вправо от линии, соответствующей стандартному образцу, то оценка предполагаемой активности была завышена и при расчётах рассчитанная активность будет ниже предполагаемой. Аналогично, если линия, соответствующая испытуемому образцу, расположена слева от линии, соответствующей стандартному образцу, то предполагаемая активность была занижена и при определении рассчитанная активность будет выше предполагаемой.

Для удовлетворительного количественного определения предполагаемая активность испытуемого образца должна быть близка к истинной активности. Исходя из предполагаемой активности испытуемого образца и аттестованной активности стандартного образца, готовят-разведения с одинаковой, по возможности, активностью. То есть соответствующие дозы стандартного образца и испытуемого образца должны вызывать одинаковый ответ. Если нет информации о предполагаемой активности, выполняют серию предварительных определений в широком диапазоне доз для установления области, в которой эта зависимость является линейной. Чем точнее определена принятая предполагаемая активность испытуемого образца к аттестованной

активности стандартного образца, тем ближе одна к другой будут эти линии, поскольку они должны давать одинаковые ответы при одинаковых дозах.

При проведении рутинных биологических испытаний обычно используют 2 или 3 дозы стандартного образца и испытуемого образца, так как одnodозовая постановка не позволяет вычислить дисперсию результатов испытания, без которой невозможна ни проверка пригодности результатов, ни вычисление доверительных границ активности испытуемого образца. Каждую дозу вводят отдельной группе экспериментальных объектов. В случае использования изолированного органа, все дозы испытывают на одном экспериментальном объекте. Получают одинаковое число ответов на каждую дозу стандартного образца и испытуемого образца – сбалансированную схему. При наличии подходящего статистического программного обеспечения (CombiStats, PLA или аналогичные) можно использовать несбалансированную схему.

При оптимизации прецизионности анализа необходимо стремиться к следующим показателям:

- 1) отношение между угловым коэффициентом и остаточной дисперсией должно быть как можно больше;
- 2) диапазон доз должен быть максимально широким;
- 3) линии «доза-ответ» должны быть расположены как можно ближе друг к другу, т. е. предполагаемая активность должна быть хорошей оценкой истинной активности.

Распределение экспериментальных единиц по различным видам воздействия может быть выполнено различными способами. В рамках модели параллельных линий применяют несколько основных дизайнов испытания.

4.2.1. Дизайн (схема) полной рандомизации

Наиболее общий случай, когда рассматривают целиком весь полученный массив данных (Примеры 1, 2, 3). Если вся совокупность экспериментальных единиц достаточно однородна, и нет указаний на то, что вариабельность результатов будет меньше внутри определенным образом сформированных подгрупп, распределение экспериментальных единиц выполняют случайным образом.

Если единицы в подгруппах (положение в пространстве или дата проведения эксперимента) распределены более однородно, чем вся совокупность в целом, прецизионность количественного определения может быть повышена путем введения в план эксперимента одного или нескольких ограничений. Распределение экспериментальных единиц с использованием этих ограничений позволяет исключить незначимые источники дисперсии.

4.2.2. Дизайн (схема) рандомизированных блоков

В этом дизайне возможно выделить идентифицируемый источник дисперсии, например, дисперсию чувствительности между помётами экспериментальных животных или дисперсию между чашками Петри в диффузионном микробиологическом анализе. В данном дизайне каждое воздействие должно быть применено одинаковое количество раз в каждом блоке (например, помёт или чашка Петри). Данный дизайн применим в том случае, если блок достаточно большой для однократного осуществления всех воздействий. Также допустимо использование дизайна рандомизированных блоков с повторениями. В пределах каждого блока воздействия должны быть распределены случайным образом. Таким образом, каждый полный набор исследуемых доз стандартного образца и испытуемого образца рассматривают как отдельный блок (Примеры 4, 5).

4.2.3. Дизайн (схема) латинского квадрата

Данный дизайн используют, если на ответ могут влиять два разных источника дисперсии, каждый из которых может принимать несколько различных уровней. Количество строк, количество столбцов и количество образцов должно быть одинаковым. Ответы записывают в квадратной форме: число строк равно числу доз, использованных в испытании. В случае двухдозовой постановки используется квадрат четыре на четыре, а в случае трёхдозовой постановки – квадрат шесть на шесть. При этом можно использовать один и тот же экспериментальный объект, например, изолированный орган. Дозы вводят в определённой последовательности, например, в виде циклического сдвига. В некоторых случаях это позволяет устранить возможное влияние одной дозы на другую (Примеры 6, 7).

4.2.4. Перекрёстный дизайн (схема)

Если каждый экспериментальный объект можно взять в испытание только один раз, исследователь вынужден иметь дело только с межгрупповой дисперсией результатов. Если же от каждого экспериментального объекта можно получить более одного ответа, то появляется внутригрупповая дисперсия. В том случае, если она меньше межгрупповой, то можно использовать двойной перекрест. Это позволяет снизить отрицательное влияние естественной вариабельности ответов и повысить валидность результатов. В качестве примера такого испытания можно привести определение активности инсулина на кроликах. Если группа в первый день получала стандартный образец, во второй день она получает испытуемый образец, если испытуемый образец, то стандартный образец, если малую дозу, то большую, если большую, то малую (пример 8).

В разделах 4.2.5.-4.2.8. приведены формулы, которые необходимы при выполнении дисперсионного анализа, а также рассмотрены конкретные примеры, позволяющие понять назначение этих формул. Приведённые формулы пригодны только для симметричных количественных определений, в которых один или более испытуемых образцов сравнивают

со стандартным образцом (S). Следует подчеркнуть, что формулы могут быть использованы только в том случае, если дозы отличаются одна от другой в одинаковое число раз, если каждый из образцов исследуется в одинаковом числе доз и если каждая доза применяется одинаковое число раз. Если эти условия не выполняются, данные формулы не должны применяться для анализа. Формулы для перекрёстной схемы испытания отличаются и приведены в примере 8.

Формулы, приведённые в разделе ниже, являются универсальными и подходят для испытаний с любым количеством доз.

4.2.5. Дисперсионный анализ для испытаний с любым количеством доз при использовании модели параллельных линий

Таблица 1. – Формулы для испытаний с d дозами каждого из образцов при использовании модели параллельных линий

	Стандартный образец (S)	1-ый Испытуемый образец (U)	h-1 Испытуемый образец (T)
Средний ответ от минимальной дозы	S_1	U_1	T_1
Средний ответ от второй дозы	S_2	U_2	T_2
...	
Средний ответ от максимальной дозы	S_d	U_d	T_d
Сумма средних ответов	$P_S = S_1 + S_2 + \dots + S_d$	$P_U = U_1 + U_2 + \dots + U_d$	$P_T = \dots$
Линейный контраст	$L_S = 1S_1 + 2S_2 + \dots + dS_d - \frac{1}{2}(d+1) \cdot P_S$	$L_U = 1U_1 + 2U_2 + \dots + dU_d - \frac{1}{2}(d+1) \cdot P_U$	$L_T = \dots$

Таблица 2. – Дополнительные формулы для дисперсионного анализа испытаний с d дозами каждого из образцов

$H_P = \frac{n}{d}$	$H_L = \frac{12n}{d^3 - d}$	$K = \frac{n(P_S + P_U + \dots)^2}{hd}$
---------------------	-----------------------------	-----------------------------------------

Таблица 3. – Формулы для расчёта суммы квадратов и числа степеней свободы при проведении испытаний с d дозами каждого из образцов

Источник дисперсии	Степени свободы (f)	Сумма квадратов
Образцы	h-1	$SS_{prep} = H_P(P_S^2 + P_U^2 + \dots) - K$
Линейная регрессия	1	$SS_{reg} = \frac{1}{h} H_L(L_S + L_U + \dots)^2$
Непараллельность	h-1	$SS_{par} = H_L(L_S^2 + L_U^2 + \dots) - SS_{reg}$
Нелинейность ^(*)	h(d-2)	$SS_{lin} = SS_{treat} - SS_{prep} - SS_{reg} - SS_{par}$
Постановки	hd-1	$SS_{treat} = n(S_1^2 + \dots + S_d^2 + T_1^2 + \dots + T_d^2) - K$

(*) Не рассчитывается для 2-ух дозовых испытаний.

Таблица 4. – Оценка остаточной дисперсии при проведении испытаний с d дозами каждого из образцов

Источник дисперсии	Степени свободы (f)	Сумма квадратов
Блоки (строки) ^(*)	n-1	$SS_{block} = hd(R_1^2 + \dots + R_n^2) - K$
Столбцы ^(**)	n-1	$SS_{col} = hd(C_1^2 + \dots + C_n^2) - K$
Остаточная дисперсия ^(***)	Полная рандомизация	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat}$
	Рандомизированный блок	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block}$
	Латинский квадрат	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block} - SS_{col}$
Общая дисперсия	nhd-1	$SS_{tot} = \sum (y - \bar{y})^2$

Для латинских квадратов эти формулы применимы только в том случае, если $n = hd$

(*) Не рассчитывается для схемы полной рандомизации.

(**) Рассчитывается только для схемы латинских квадратов.

(***) Зависит от схемы рандомизации.

Анализ валидности. Полученные данные должны соответствовать условиям 1, 2, 3, 4А, 5А (раздел 4.1. *Общие принципы*). Значимость различий дисперсий проверяют с помощью критерия Фишера. Обязательным является выполнение требований для показателей «Линейная регрессия», «Непараллельность», «Нелинейность». Для показателя «Линейная регрессия» наблюдаемое значение критерия Фишера должно быть больше критического, а для показателей «Непараллельность» и «Нелинейность» – меньше критического ($p = 0,05$). Для того чтобы найти $F_{\text{набл.}}$ каждого из источников дисперсии средние квадраты каждого показателя делят на средний квадрат показателя «Остаточная дисперсия». Полученные результаты сравнивают с табличными значениями критерия Фишера – таблица 66.

Значимое отклонение от параллельности при анализе нескольких испытуемых образцов может быть обусловлено отличием углового коэффициента линии «доза-ответ» лишь одного из образцов от других. В этом случае допустимо исключить результаты, полученные для этого образца, и повторить статистический анализ заново, вместо того, чтобы признать весь анализ недействительным.

4.2.6. Оценка активности и границ доверительных интервалов для испытаний с любым количеством доз при использовании модели параллельных линий

После подтверждения валидности рассчитывают общий для всех линий угловой коэффициент:

$$b = \frac{H_L(L_S + L_U + \dots)}{Inh}$$

где: I – натуральный логарифм соотношения доз.

Натуральный логарифм отношения значения рассчитанной активности испытуемого образца (R_T) к значению заявленной активности испытуемого образца (A_T) вычисляют по формуле:

$$M_T = \ln\left(\frac{R_T}{A_T}\right) = \frac{P_T - P_S}{db}$$

Рассчитанную активность испытуемого образца вычисляют по формуле:

$$R_T = A_T \cdot \exp(M_T)$$

Вычисляют доверительный интервал для полученного значения:

$$\pm \Delta = CM_T \pm \sqrt{(C - 1) \cdot (CM_T^2 + 2V)}$$

где: $C = \frac{SS_{reg}}{SS_{reg} - s^2 t^2}$;

$$s^2 = \frac{SS_{res}}{f_{res}};$$

t – критерий Стьюдента, см. таблицу 67 (при $p = 0,05$);

$$V = \frac{SS_{reg}}{b^2 dn}$$

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: $A_T \cdot e^{-\Delta}$ и $A_T \cdot e^{+\Delta}$ соответственно.

Если будет установлено, что активности исходных растворов, приготовленных исходя из предполагаемой и аттестованной активностей, не равны между собой, следует ввести поправочный коэффициент.

4.2.7. Дисперсионный анализ для испытаний с двумя или тремя дозами каждого из образцов при использовании модели параллельных линий

Для модели параллельных линий наиболее распространены количественные испытания с двумя или тремя дозами. Для двухдозовых или трёхдозовых испытаний представленные выше алгоритмы статистической обработки могут быть упрощены и возможно использовать формулы, приведённые ниже.

Таблица 5. – Формулы для испытаний с 2 дозами каждого из образцов

	Стандартный образец (S)	1-ый Испытуемый образец (U)	h-1 Испытуемый образец (T)	Сумма
Суммарный ответ от минимальной дозы	S ₁	U ₁	T ₁	–
Суммарный ответ от максимальной дозы	S ₂	U ₂	T ₂	–
Сумма	S=S ₁ + S ₂	U=U ₁ +U ₂	T=...	$\sum y = S + U + \dots + T$
Линейный контраст	L _S =S ₂ -S ₁	L _U =U ₂ -U ₁	L _T =...	$\sum L = L_S + L_U + \dots + L_T$

Таблица 6. – Формулы для испытаний с 3 дозами каждого из образцов

	Стандартный образец (S)	1-ый Испытуемый образец (U)	h-1 Испытуемый образец (T)	Сумма
Суммарный ответ от минимальной дозы	S ₁	U ₁	T ₁	–
Суммарный ответ от второй дозы	S ₂	U ₂	T ₂	–
Суммарный ответ от	S ₃	U ₃	T ₃	–

максимальной дозы				
Сумма	$S=S_1+ S_2+ S_3$	$U=U_1+U_2+U_3$	$T=...$	$\sum y = S + U+... +T$
Линейный контраст	$L_S=S_3-S_1$	$L_U=U_3-U_1$	$L_T=...$	$\sum L =$ $= L_S + L_U+... +L_T$

Таблица 7. – *Дополнительные формулы для дисперсионного анализа испытаний с 2 или 3 дозами каждого из образцов*

Поправочный коэффициент	$K = \frac{(\sum y)^2}{N}$
-------------------------	----------------------------

Таблица 8. – *Формулы для расчёта суммы квадратов и числа степеней свободы при проведении испытаний с 2 или 3 дозами каждого из образцов*

Источник дисперсии	Степени свободы (f)	Сумма квадратов
Образцы	$h-1$	$SS_{prep} = \frac{S^2 + U^2+... +T^2}{dn} - K$
Линейная регрессия	1	$SS_{reg} = \frac{(\sum L)^2}{2nh} = E$
Непараллельность	$h-1$	$SS_{par} = \frac{L_S^2 + L_U^2 + ... + L_T^2}{2n} - E$
Нелинейность ^(*)	$h(d-2)$	$SS_{lin} = SS_{treat} - SS_{prep} - SS_{reg} - SS_{par}$
Постановки	$hd-1$	$SS_{treat} = \frac{S_1^2+... +S_d^2+... +T_d^2}{n} - K$

(*) Не рассчитывают для двухдозовых испытаний.

Таблица 9. – *Оценка остаточной дисперсии для испытаний с 2 или 3 дозами каждого из образцов*

Источник дисперсии		Степени свободы (f)	Сумма квадратов
Блоки (строки) ^(*)		$n-1$	$SS_{block} = \frac{R_1^2+... +R_n^2}{hd} - K$
Столбцы ^(**)		$n-1$	$SS_{col} = \frac{C_1^2+... +C_n^2}{hd} - K$
Остаточная дисперсия ^(***)	Полная рандомизация	$hd(n-1)$	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat}$
	Рандомизированный блок	$(hd-1)(n-1)$	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block}$
	Латинский квадрат	$(hd-2)(n-1)$	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block} - SS_{col}$
Общая дисперсия		$nhd-1$	$SS_{tot} = \sum (y^2) - K$

Для латинских квадратов эти формулы применимы только в том случае, если $n = hd$

(*) Не рассчитывается для схемы полной рандомизации.

(**) Рассчитывают только для схемы латинских квадратов.

(***) Зависит от схемы рандомизации.

Анализ валидности. Полученные данные должны соответствовать условиям 1, 2, 3, 4А, 5А (раздел 4.1. *Общие принципы*). Значимость различий дисперсий проверяют с помощью критерия Фишера. Обязательным является выполнение требований для показателей «Линейная регрессия», «Непараллельность», «Нелинейность». Для показателя «Линейная регрессия» наблюдаемое значение критерия Фишера должно быть больше критического, а для показателей «Непараллельность» и «Нелинейность» – меньше критического ($p = 0,05$). Для того чтобы найти $F_{\text{набл}}$ каждого из источников дисперсии средние квадраты каждого показателя делят на средний квадрат показателя «Остаточная дисперсия». Полученные результаты сравнивают с табличными критическими значениями критерия Фишера – таблица 66.

Значимое отклонение от параллельности при анализе нескольких испытуемых образцов может быть обусловлено отличием углового коэффициента линии «доза-ответ» лишь одного из образцов от других. В этом случае допустимо исключить результаты, полученные для этого образца, и повторить статистический анализ заново, вместо того, чтобы признать весь анализ недействительным.

4.2.8. Оценка активности и границ доверительных интервалов для испытаний с двумя или тремя дозами каждого из образцов при использовании модели параллельных линий

После подтверждения валидности рассчитывают общий для всех линий угловой коэффициент:

$$b = \frac{\sum L}{Inh \cdot (d - 1)}$$

где: I – десятичный логарифм соотношения доз.

Десятичный логарифм отношения значения рассчитанной активности испытуемого образца (R_U) к значению заявленной активности испытуемого образца (A_U) вычисляют по формуле:

$$\begin{aligned} \dot{M}_U &= \lg\left(\frac{R_U}{A_U}\right) = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} \\ \bar{y}_S &= \frac{S}{dn}; \quad \bar{y}_U = \frac{U}{dn} \end{aligned}$$

Рассчитанную активность испытуемого образца вычисляют по формуле:

$$R_U = A_U \cdot 10^{M_U}$$

Вычисляют доверительный интервал для полученного значения.

$$\pm \Delta = C \hat{M}_U \pm \sqrt{(C - 1) \cdot (C \hat{M}_U^2 + \acute{e}I^2)}$$

где: $C = \frac{E}{E - s^2 \cdot t^2}$;

$$s^2 = \frac{SS_{res}}{f_{res}};$$

t – критерий Стьюдента, см. таблицу 67 (при p = 0,05);

\acute{e} – коэффициент из таблицы 68.

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: $A_U \cdot 10^{-\Delta}$ и $A_U \cdot 10^{+\Delta}$ соответственно.

Если будет установлено, что активности исходных растворов, приготовленных исходя из предполагаемой и аттестованной активностей, не равны между собой, следует ввести поправочный коэффициент.

Следующий раздел приведён для информации

ПРИМЕР 1

Полная рандомизация с использованием двух доз для определения биологической активности гонадотропина хорионического.

При решении использованы формулы, приведённые в таблицах 5, 7 – 9.

Если в качестве экспериментальных объектов используют крыс-самок, то в качестве ответа животного принимают отношение массы матки в мг к массе тела в г. В случае использования самцов, ответ животного представляет собой отношение массы добавочных половых желёз в мг к массе тела в г.

Для определения активности гонадотропина хорионического использовали 4 группы крыс-самок по 10 особей в каждой. Каждую из доз испытуемого образца и стандартного образца, вводили одной группе животных (соотношение доз 1:2, т. е. $I = \lg 2$).

В таблице 10 даны ответы крыс-самок на введение двух доз стандартного образца и двух доз испытуемого образца.

Таблица 10. – *Относительная масса матки крыс*

s ₁	s ₂	u ₁	u ₂
0,398	2,233	0,533	3,447

0,443	2,129	0,663	3,123
0,483	2,872	0,434	3,354
0,623	2,732	0,710	1,769
0,462	3,043	0,637	4,382
0,619	2,717	0,470	3,525
0,436	2,939	0,650	3,331
0,495	1,785	0,600	3,995
0,568	3,474	0,820	2,977
0,593	3,120	0,512	2,556

Таблица 11. – Суммы ответов и линейные контрасты

	Стандартный образец (S)	Испытуемый образец (U)	Сумма
Суммарный ответ от минимальной дозы	$S_1=5,12$	$U_1=6,03$	
Суммарный ответ от максимальной дозы	$S_2=27,04$	$U_2=32,46$	
Сумма	$S=32,16$	$U=38,49$	$\sum y = 70,65$
Линейный контраст	$L_S=21,92$	$L_U=26,43$	$\sum L = 48,35$

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N} = \frac{70,65^2}{40} = 124,8;$$

$$SS_{prep} = \frac{S^2 + U^2}{2n} - K = \frac{32,16^2 + 38,49^2}{2 \cdot 10} - 124,8 = 0,99;$$

$$SS_{reg} = \frac{(\sum L)^2}{2nh} = \frac{48,35^2}{2 \cdot 10 \cdot 2} = 58,44 = E;$$

$$SS_{par} = \frac{L_S^2 + L_U^2}{2n} - E = \frac{21,92^2 + 26,43^2}{2 \cdot 10} - 58,44 = 0,51;$$

$$SS_{treat} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + U_1^2 + U_2^2}{n} - K = \frac{5,12^2 + 27,04^2 + 6,03^2 + 32,46^2}{10} - 124,8 = 59,94;$$

$$SS_{tot} = \sum (y^2) - K = 192,03 - 124,8 = 67,23;$$

$$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} = 67,23 - 59,94 = 7,29.$$

Таблица 12. – Сводная таблица дисперсионного анализа

Источник дисперсии	Число степеней свободы (f)	Сумма квадратов	Средний квадрат $\frac{\text{Сумма квадратов}}{f}$	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{\text{набл.}}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{\text{критич.}}$ (p = 0,05)
Образцы	1	0,99	0,99		
Линейная регрессия	1	58,44	58,44	292,20	>4,11
Непараллельность	1	0,51	0,51	2,55	<4,11
Постановки	2·2-1=3	59,94	19,98		
Остаточная дисперсия	2·2(10-1)=36	7,29	0,20		
Итог (общая дисперсия)	10·2·2-1=39	67,23	1,72		

Вычисление биологической активности:

$$b = \frac{\sum L}{\ln h \cdot (d - 1)} = \frac{48,35}{\lg 2 \cdot 10 \cdot 2 \cdot (2 - 1)} = 8,03;$$

$$\bar{y}_S = \frac{32,16}{2 \cdot 10} = 1,61;$$

$$\bar{y}_U = \frac{38,49}{2 \cdot 10} = 1,92;$$

$$\dot{M}_U = \frac{(\bar{y}_U - \bar{y}_S)}{b} = \frac{1,92 - 1,61}{8,03} = 0,039;$$

$$A_U = 1000 \text{ ME/фл};$$

$$R_U = 1000 \cdot 10^{0,039} = 1093,96 \text{ ME/фл};$$

Вычисление доверительных границ биологической активности:

$$s^2 = 0,20$$

$$t = 2,03 \text{ (при } f = 36)$$

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} = \frac{58,44}{58,44 - 0,20 \cdot 2,03^2} = 1,014;$$

$$\dot{c} = 1 \text{ (из таблицы 68)}$$

$$\begin{aligned}
 -\Delta &= C\dot{M}_U - \sqrt{(C-1) \cdot (C\dot{M}_U^2 + \dot{\epsilon}I^2)} = \\
 &= 1,014 \cdot 0,039 - \sqrt{(1,014-1) \cdot (1,014 \cdot 0,039^2 + 1 \cdot lg2^2)} = 0,0036; \\
 +\Delta &= C\dot{M}_U + \sqrt{(C-1) \cdot (C\dot{M}_U^2 + \dot{\epsilon}I^2)} = \\
 &= 1,014 \cdot 0,039 + \sqrt{(1,014-1) \cdot (1,014 \cdot 0,039^2 + 1 \cdot lg2^2)} = 0,0755.
 \end{aligned}$$

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: $1000 \cdot 10^{0,0036}$ и $1000 \cdot 10^{0,0755}$, т.е. 1008,3 МЕ/фл. и 1189,9 МЕ/фл. соответственно.

Следующий раздел приведён для информации

ПРИМЕР 2

Полная рандомизация с использованием трёх доз для определения биологической активности гонадотропина хорионического.

При решении использованы формулы, приведённые в таблицах 6 – 9.

Если в качестве экспериментальных объектов используют крыс-самок, то в качестве ответа животного принимают отношение массы матки в мг к массе тела в г. В случае использования самцов, ответ животного представляет собой отношение массы добавочных половых желёз в мг к массе тела в г.

Для определения активности гонадотропина хорионического использовали 6 групп крыс-самок по 10 особей в каждой. Каждую дозу испытуемого образца и стандартного образца, вводили одной группе животных (соотношение доз 1:2, т.е. $I = lg2$).

В таблице 13 даны ответы крыс-самок на введение трёх доз стандартного образца и трёх доз испытуемого образца.

Таблица 13. – *Относительная масса матки крыс*

s1	s2	s3	u1	u2	u3
0,398	1,583	2,233	0,533	1,655	3,447
0,443	0,780	2,129	0,663	0,935	3,123
0,483	2,380	2,872	0,434	1,973	3,354
0,623	0,984	2,732	0,710	2,199	1,769
0,462	1,265	3,043	0,637	0,886	4,382
0,619	1,568	2,717	0,470	1,097	3,525
0,436	1,167	2,939	0,65	2,447	3,331

0,495	1,743	1,785	0,600	1,941	3,995
0,568	1,375	3,474	0,820	1,151	2,977
0,593	1,375	3,120	0,512	2,804	2,556

Таблица 14. – Суммы ответов и линейные контрасты

	Стандартный образец (S)	Испытуемый образец (U)	Сумма
Суммарный ответ от минимальной дозы	$S_1=5,12$	$U_1=6,03$	
Суммарный ответ от второй дозы	$S_2=14,22$	$U_2=17,09$	
Суммарный ответ от максимальной дозы	$S_3=27,04$	$U_3=32,46$	
Сумма	$S=46,38$	$U=55,58$	$\sum y = 101,96$
Линейный контраст	$L_S=21,92$	$L_U=26,43$	$\sum L = 48,35$

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N} = \frac{101,96^2}{60} = 173,26;$$

$$SS_{prep} = \frac{S^2 + U^2}{3n} - K = \frac{46,38^2 + 55,58^2}{3 \cdot 10} - 173,26 = 1,41;$$

$$SS_{reg} = \frac{(\sum L)^2}{2nh} = \frac{48,35^2}{2 \cdot 10 \cdot 2} = 58,44 = E;$$

$$SS_{par} = \frac{L_S^2 + L_U^2}{2n} - E = \frac{21,92^2 + 26,43^2}{2 \cdot 10} - 58,44 = 0,51;$$

$$SS_{treat} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + U_1^2 + U_2^2 + U_3^2}{n} - K =$$

$$= \frac{5,12^2 + 14,22^2 + 27,04^2 + 6,03^2 + 17,09^2 + 32,46^2}{10} - 173,26 = 60,9;$$

$$SS_{lin} = SS_{treat} - SS_{prep} - SS_{reg} - SS_{par} = 60,9 - 1,41 - 58,44 - 0,51 =$$

$$= 0,54;$$

$$SS_{tot} = \sum (y^2) - K = 247,3 - 173,26 = 74,04;$$

$$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} = 74,04 - 60,9 = 13,14.$$

Таблица 15. – Сводная таблица дисперсионного анализа

Источник дисперсии	Число степеней свободы (f)	Сумма квадратов	Средний квадрат Сумма квадратов f	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{\text{набл.}}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{\text{критич.}}$ ($p = 0,05$)
Образцы	1	1,41	1,41		
Линейная регрессия	1	58,44	58,44	243,50	>4,02
Непараллельность	1	0,51	0,51	2,13	<4,02
Нелинейность	$2 \cdot (3-2)=2$	0,54	0,27	1,13	<3,17
Постановки	$2 \cdot 3 - 1 = 5$	60,90	12,18		
Остаточная дисперсия	$2 \cdot 3 \cdot (10-1) = 54$	13,14	0,24		
Итог (общая дисперсия)	$10 \cdot 2 \cdot 3 - 1 = 59$	74,04	1,25		

Вычисление биологической активности:

$$b = \frac{\sum L}{\ln h \cdot (d - 1)} = \frac{48,35}{\lg 2 \cdot 10 \cdot 2 \cdot (3 - 1)} = 4,02;$$

$$\bar{y}_S = \frac{46,38}{3 \cdot 10} = 1,55;$$

$$\bar{y}_U = \frac{55,58}{3 \cdot 10} = 1,85;$$

$$M_U = \frac{(\bar{y}_U - \bar{y}_S)}{b} = \frac{1,85 - 1,55}{4,02} = 0,075;$$

$$A_U = 1000 \text{ ME/фл};$$

$$R_U = 1000 \cdot 10^{0,075} = 1188,50 \text{ ME/фл};$$

Вычисление доверительных границ биологической активности:

$$s^2 = 0,24$$

$$t = 2 \text{ (при } f = 54)$$

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} = \frac{58,44}{58,44 - 0,24 \cdot 2,00^2} = 1,017;$$

$$c = 8/3 \text{ (из таблицы 68)}$$

$$\begin{aligned}
 -\Delta &= C\dot{M}_U - \sqrt{(C-1) \cdot (C\dot{M}_U^2 + \epsilon I^2)} = \\
 &= 1,017 \cdot 0,075 - \sqrt{(1,017-1) \cdot (1,017 \cdot 0,075^2 + 8/3 \cdot lg2^2)} = 0,0114; \\
 +\Delta &= C\dot{M}_U + \sqrt{(C-1) \cdot (C\dot{M}_U^2 + \epsilon I^2)} = \\
 &= 1,017 \cdot 0,075 + \sqrt{(1,017-1) \cdot (1,017 \cdot 0,075^2 + 8/3 \cdot lg2^2)} = 0,1411.
 \end{aligned}$$

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: $1000 \cdot 10^{0,0114}$ и $1000 \cdot 10^{0,1411}$, т.е. 1026,6 МЕ/фл и 1383,9 МЕ/фл соответственно.

Следующий раздел приведён для информации

ПРИМЕР 3

Полная рандомизация с использованием пяти доз для определения активности вакцины против гепатита В.

При решении использованы формулы, приведённые в таблицах 1 – 4.

Из каждой вакцины были приготовлены 5 двукратных разведений (соотношение доз 1:2, т.е. $I = \ln 2$), из которых затем были отобраны по три независимые серии. После нескольких дополнительных шагов в процедуре анализа измеряли оптическую плотность образцов.

В таблице 16 приведены значения оптической плотности стандартных образцов и испытуемых образцов. Известно, что логарифмы значений оптической плотности имеют линейную зависимость от логарифмов доз. Преобразованные \ln -трансформацией значения оптической плотности приведены в таблице 17.

Таблица 16. – Значения оптической плотности образцов

S	s1	0,043	0,045	0,051
	s2	0,093	0,099	0,082
	s3	0,159	0,154	0,166
	s4	0,283	0,295	0,362
	s5	0,514	0,531	0,545
U	u1	0,097	0,097	0,094
	u2	0,167	0,157	0,178
	u3	0,327	0,355	0,345
	u4	0,501	0,665	0,576
	u5	1,140	1,386	1,051
T	t1	0,086	0,071	0,073
	t2	0,127	0,146	0,133
	t3	0,277	0,268	0,269
	t4	0,586	0,489	0,546
	t5	0,957	0,866	1,045
V	v1	0,082	0,082	0,086

	v2	0,145	0,144	0,173
	v3	0,318	0,306	0,316
	v4	0,552	0,551	0,624
	v5	1,037	1,039	1,068

Таблица 17. – Трансформированные значения оптической плотности образцов ($\ln(y)$)

S	s1	-3,147	-3,101	-2,976
	s2	-2,375	-2,313	-2,501
	s3	-1,839	-1,871	-1,796
	s4	-1,262	-1,221	-1,016
	s5	-0,666	-0,633	-0,607
U	u1	-2,333	-2,333	-2,364
	u2	-1,790	-1,852	-1,726
	u3	-1,118	-1,036	-1,064
	u4	-0,691	-0,408	-0,552
	u5	0,131	0,326	0,050
T	t1	-2,453	-2,645	-2,617
	t2	-2,064	-1,924	-2,017
	t3	-1,284	-1,317	-1,313
	t4	-0,534	-0,715	-0,605
	t5	-0,044	-0,144	0,044
V	v1	-2,501	-2,501	-2,453
	v2	-1,931	-1,938	-1,754
	v3	-1,146	-1,184	-1,152
	v4	-0,594	-0,596	-0,472
	v5	0,036	0,038	0,066

Таблица 18. – Средние ответы и линейные контрасты

	Стандартный образец (S)	1-ый Испытуемый образец (U)	2-ой Испытуемый образец (T)	3-ий Испытуемый образец (V)
Средний ответ от минимальной дозы	$S_1 = -3,075$	$U_1 = -2,344$	$T_1 = -2,572$	$V_1 = -2,485$
Средний ответ от второй дозы	$S_2 = -2,396$	$U_2 = -1,789$	$T_2 = -2,002$	$V_2 = -1,874$
Средний ответ от третьей дозы	$S_3 = -1,835$	$U_3 = -1,073$	$T_3 = -1,305$	$V_3 = -1,161$
Средний ответ от четвёртой дозы	$S_4 = -1,166$	$U_4 = -0,550$	$T_4 = -0,618$	$V_4 = -0,554$
Средний ответ от максимальной дозы	$S_5 = -0,635$	$U_5 = 0,169$	$T_5 = -0,048$	$V_5 = 0,047$
Сумма средних ответов	$P_S = -9,108$	$P_U = -5,586$	$P_T = -6,544$	$P_V = -6,027$
Линейный контраст	$L_S = 6,109$	$L_U = 6,264$	$L_T = 6,431$	$L_V = 6,384$

$$H_P = \frac{n}{d} = \frac{3}{5} = 0,6;$$

$$H_L = \frac{12n}{d^3 - d} = \frac{12 \cdot 3}{5^3 - 5} = 0,3;$$

$$K = \frac{n(P_S + P_U + P_T + P_V)^2}{hd} =$$

$$= \frac{3 \cdot (-9,108 - 5,586 - 6,544 - 6,027)^2}{4 \cdot 5} = 111,52;$$

$$SS_{prep} = H_P(P_S^2 + P_U^2 + P_T^2 + P_V^2) - K =$$

$$= 0,6((-9,108)^2 + (-5,586)^2 + (-6,544)^2 + (-6,027)^2) - 111,52 = 4,48;$$

$$SS_{reg} = \frac{1}{h} H_L(L_S + L_U + L_T + L_V)^2 =$$

$$= \frac{1}{4} \cdot 0,3 \cdot (6,109 + 6,264 + 6,431 + 6,384)^2 = 47,58;$$

$$SS_{par} = H_L(L_S^2 + L_U^2 + L_T^2 + L_V^2) - SS_{reg}$$

$$= 0,3(6,109^2 + 6,264^2 + 6,431^2 + 6,384^2) - 47,58 = 0,0187;$$

$$SS_{treat} = n(S_1^2 + S_2^2 + \dots + S_5^2 + \dots + V_5^2) - K =$$

$$= 3((-3,075)^2 + (-2,396)^2 + \dots + (-0,635)^2 + \dots + 0,047^2) - 111,52 = 52,15;$$

$$SS_{lin} = SS_{treat} - SS_{prep} - SS_{reg} - SS_{par} =$$

$$= 52,15 - 4,48 - 47,58 - 0,0187 = 0,074;$$

$$SS_{tot} = \sum(y - \bar{y})^2 = 52,42;$$

$$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} = 52,42 - 52,15 = 0,27.$$

Таблица 19. – Сводная таблица дисперсионного анализа

Источник дисперсии	Число степеней свободы (f)	Сумма квадратов	Средний квадрат Сумма квадратов f	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{набл.}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{критич.}$ ($p = 0,05$)
Образцы	3	4,48	1,49		
Линейная регрессия	1	47,58	47,58	7126	>4,08
Непараллельность	3	0,0187	0,006	0,933	<2,84
Нелинейность	$4 \cdot (5 - 2) = 12$	0,074	0,006	0,926	<2,00

Постановки	4·5- 1=19	52,15	2,74		
Остаточная дисперсия	4·5·(3-1) =40	0,27	0,0068		
Итог (общая дисперсия)	3·4·5-1=59	52,42	0,888		

Вычисление активности образца U:

$$b = \frac{H_L(L_S + L_U + L_T + L_V)}{lnh} =$$

$$= \frac{0,3 * (6,109 + 6,264 + 6,431 + 6,384)}{ln2 \cdot 3 \cdot 4} = 0,90848;$$

$$M_U = \frac{P_U - P_S}{db} = \frac{-5,586 - (-9,108)}{5 \cdot 0,91} = 0,7752;$$

$$A_U = 20 \text{ мкг белка/мл};$$

$$R_U = A_U \cdot \exp(M_U) = 20 \cdot e^{0,78} = 43,4 \text{ мкг белка/мл};$$

Вычисление доверительных границ активности образца U:

$$s^2 = 0,0067$$

$$t = 2,021 \text{ (при } f = 40)$$

$$C = \frac{SS_{reg}}{SS_{reg} - s^2 t^2} = \frac{47,58}{47,58 - 0,0067 \cdot 2,021^2} = 1,00057;$$

$$V = \frac{SS_{reg}}{b^2 dn} = \frac{47,58}{0,91^2 \cdot 5 \cdot 3} = 3,8436;$$

$$+\Delta = CM_U + \sqrt{(C - 1) \cdot (C \cdot M_U^2 + 2V)} =$$

$$= 1,00057 \cdot 0,7752 + \sqrt{(1,00057 - 1) \cdot (1,00057 \cdot 0,7752^2 + 2 \cdot 3,8436)} =$$

$$= 0,8444;$$

$$-\Delta = CM_U - \sqrt{(C - 1) \cdot (C \cdot M_U^2 + 2V)} =$$

$$= 1,00057 \cdot 0,7752 - \sqrt{(1,00057 - 1) \cdot (1,00057 \cdot 0,7752^2 + 2 \cdot 3,8436)} =$$

$$= 0,7069.$$

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: $20 \cdot e^{0,7069}$ и $20 \cdot e^{0,8444}$, т.е. 40,5 мкг белка/мл и 46,5 мкг белка/мл соответственно.

Аналогично вычисляют активность и доверительные границы для других испытуемых образцов. Полученные результаты представлены в таблице 15-20:

Таблица 20. – *Результаты оценки активностей испытуемых вакцин (мкг белка/мл) и доверительные интервалы*

	Нижняя граница	Оценка	Верхняя граница
Образец U	40,5	43,4	46,5
Образец T	32,9	35,2	37,6
Образец V	36,8	39,4	42,2

Следующий раздел приведён для информации

ПРИМЕР 4

Метод рандомизированных блоков с использованием двух доз для определения биологической активности окситоцина на петушке.

При решении использованы формулы, приведённые в таблицах 5, 7 – 9.

При использовании петушка в качестве экспериментального объекта, ответом является величина падения артериального давления (мм.рт.ст.) при введении двух доз стандартного образца окситоцина и двух доз испытуемого образца.

Петушку вводили по две дозы стандартного образца и две дозы испытуемого образца окситоцина (соотношение доз 1:2, т.е. $I = \lg 2$). Порядок введения доз и ответы приведены в таблице 21.

Таблица 21. – *Порядок введения доз и ответы петушка на введение стандартного образца и испытуемого образца окситоцина*

	s ₁	s ₂	u ₁	u ₂	Блоки (R)
1.	12	20	14	20	66
2.	15	23	16	22	76
3.	15	20	14	23	72
4.	15	20	14	24	73

Таблица 22. – *Суммы ответов и контрасты*

	Стандартный образец (S)	Испытуемый образец (U)	Сумма
Суммарный ответ от минимальной дозы	S ₁ =57	U ₁ =58	
Суммарный ответ от максимальной дозы	S ₂ =83	U ₂ =89	
Сумма	S=140	U=147	$\sum y = 287$
Линейный контраст	L _S =26	L _U =31	$\sum L = 57$

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N} = \frac{287^2}{16} = 5148,06;$$

$$SS_{prep} = \frac{S^2 + U^2}{2n} - K = \frac{140^2 + 147^2}{2 \cdot 4} - 5148,06 = 3,065;$$

$$SS_{reg} = \frac{(\sum L)^2}{2nh} = \frac{57^2}{2 \cdot 4 \cdot 2} = 203,06 = E;$$

$$SS_{par} = \frac{L_S^2 + L_U^2}{2n} - E = \frac{26^2 + 31^2}{2 \cdot 4} - 203,06 = 1,565;$$

$$SS_{treat} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + U_1^2 + U_2^2}{n} - K =$$

$$= \frac{57^2 + 83^2 + 58^2 + 89^2}{4} - 5148,06 = 207,69;$$

$$SS_{block} = \frac{R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + R_4^2}{hd} - K =$$

$$= \frac{66^2 + 76^2 + 72^2 + 73^2}{2 \cdot 2} - 5148,06 = 13,19;$$

$$SS_{tot} = \sum (y^2) - K = 5381 - 5148,06 = 232,94;$$

$$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block} = 232,94 - 207,69 - 13,19 = 12,06.$$

Таблица 23. – Сводная таблица дисперсионного анализа

Источник дисперсии	Число степеней свободы (f)	Сумма квадратов	Средний квадрат Сумма квадратов f	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{набл.}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{критич.}$ ($p = 0,05$)
Образцы	1	3,07	3,07		
Линейная регрессия	1	203,06	203,06	151,54	>5,12
Непараллельность	1	1,57	1,57	1,17	<5,12
Постановки	2·2-1=3	207,69	69,23		
Блоки	3	13,19	4,40	3,28	<3,86
Остаточная дисперсия	(2·2-1)(4-1)=9	12,06	1,34		

Итог (общая дисперсия)	$4 \cdot 2 \cdot 2 - 1 = 15$	232,94	15,53		
------------------------	------------------------------	--------	-------	--	--

Вычисление биологической активности:

$$b = \frac{\sum L}{\ln h \cdot (d - 1)} = \frac{57}{\lg 2 \cdot 4 \cdot 2 \cdot (2 - 1)} = 23,67;$$

$$\bar{y}_S = \frac{140}{2 \cdot 4} = 17,50;$$

$$\bar{y}_U = \frac{147}{2 \cdot 4} = 18,38;$$

$$\dot{M}_U = \frac{(\bar{y}_U - \bar{y}_S)}{b} = \frac{18,38 - 17,50}{23,67} = 0,037;$$

$$A_U = 5 \text{ МЕ/мл};$$

$$R_U = 5 \cdot 10^{0,037} = 5,45 \text{ МЕ/мл};$$

Вычисление доверительных границ биологической активности:

$$s^2 = 1,34$$

$$t = 2,262 \text{ (при } f = 9)$$

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} = \frac{203,06}{203,06 - 1,34 \cdot 2,262^2} = 1,035;$$

$$\dot{c} = 1 \text{ (из таблицы 68)}$$

$$\begin{aligned} -\Delta &= C \dot{M}_U - \sqrt{(C - 1) \cdot (C \dot{M}_U^2 + \dot{c} I^2)} = \\ &= 1,035 \cdot 0,037 - \sqrt{(1,035 - 1) \cdot (1,035 \cdot 0,037^2 + 1 \cdot \lg 2^2)} = -0,0185; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} +\Delta &= C \dot{M}_U + \sqrt{(C - 1) \cdot (C \dot{M}_U^2 + \dot{c} I^2)} = \\ &= 1,035 \cdot 0,037 + \sqrt{(1,035 - 1) \cdot (1,035 \cdot 0,037^2 + 1 \cdot \lg 2^2)} = 0,0950. \end{aligned}$$

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: $5 \cdot 10^{-0,0185}$ и $5 \cdot 10^{0,0950}$, т.е. 4,79 МЕ/мл и 6,22 МЕ/мл соответственно.

Следующий раздел приведён для информации

ПРИМЕР 5

Метод рандомизированных блоков с использованием трёх доз для определения активности антибиотика методом диффузии в агар с использованием прямоугольного планшета.

При решении использованы формулы, приведённые в таблицах из таблицы 6 – из таблицы 9.

Активность антибиотика определяли по зонам угнетения роста микроорганизмов. Для анализа потребовалось шесть планшетов (20 мм*150 мм), каждый из которых содержал девять лунок. Последовательность внесения растворов в лунки приведена в таблице из таблицы 24. Соотношение концентраций 1:2, т.е. $I = \lg 2$. В качестве ответа принимали диаметр зоны угнетения роста микроорганизмов в мм, умноженный на 10.

Таблица из таблицы 24. – *Расположение образцов и их доз в планшетах*

Номер планшета	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	s ₃	u ₂	z ₁	u ₃	z ₂	s ₁	z ₃	s ₂	u ₁
2.	s ₂	u ₁	z ₃	u ₂	z ₁	s ₃	z ₂	s ₁	u ₃
3.	s ₁	u ₃	z ₂	u ₁	z ₃	s ₂	z ₁	s ₃	u ₂
4.	u ₃	z ₂	s ₁	z ₃	s ₂	u ₁	s ₃	u ₂	z ₁
5.	u ₂	z ₁	s ₃	z ₂	s ₁	u ₃	s ₂	u ₁	z ₃
6.	u ₁	z ₃	s ₂	z ₁	s ₃	u ₂	s ₁	u ₃	z ₂

Таблица 25. – *Измеренные зоны ингибирования роста в мм*10*

Номер планшета	s ₁	s ₂	s ₃	u ₁	u ₂	u ₃	z ₁	z ₂	z ₃	Блоки (R)
1.	176	205	235	174	202	232	176	205	234	1839
2.	178	208	238	175	206	234	176	207	237	1859
3.	178	207	237	177	203	236	175	204	236	1853
4.	175	205	235	173	201	232	175	208	236	1840
5.	176	206	235	174	204	231	176	206	237	1845
6.	174	204	236	170	202	229	178	205	234	1832

Таблица 26. – *Суммы ответов и контрасты*

	Стандартный образец (S)	Испытуемый образец (U)	Испытуемый образец (Z)	Сумма
Суммарный ответ от	S ₁ =1057	U ₁ =1043	Z ₁ =1056	

минимальной дозы				
Суммарный ответ от второй дозы	$S_2=1235$	$U_2=1218$	$Z_2=1235$	
Суммарный ответ от максимальной дозы	$S_3=1416$	$U_3=1394$	$Z_3=1414$	
Сумма	$S=3708$	$U=3655$	$Z=3705$	$\sum y = 11068$
Линейный контраст	$L_S=359$	$L_U=351$	$Z=358$	$\sum L = 1068$

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N} = \frac{11068^2}{54} = 2\,268\,530,07;$$

$$SS_{prep} = \frac{S^2 + U^2 + Z^2}{3 \cdot n} - K =$$

$$= \frac{3708^2 + 3655^2 + 3705^2}{3 \cdot 6} - 2\,268\,530,07 = 98,48;$$

$$SS_{reg} = \frac{(\sum L)^2}{2nh} = \frac{1068^2}{2 \cdot 6 \cdot 3} = 31684 = E;$$

$$SS_{par} = \frac{L_S^2 + L_U^2 + L_Z^2}{2n} - E =$$

$$= \frac{359^2 + 351^2 + 358^2}{2 \cdot 6} - 31684 = 3,17;$$

$$SS_{treat} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + Z_1^2 + Z_2^2 + Z_3^2}{n} - K =$$

$$= \frac{1057^2 + 1235^2 + 1416^2 + \dots + 1414^2}{6} - 2\,268\,530,07 = 31785,93;$$

$$SS_{lin} = SS_{treat} - SS_{prep} - SS_{reg} - SS_{par} =$$

$$= 31785,93 - 98,48 - 31684 - 3,17 = 0,28;$$

$$SS_{block} = \frac{R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + R_4^2 + R_5^2 + R_6^2}{hd} - K =$$

$$= \frac{1839^2 + 1859^2 + \dots + 1832^2}{3 \cdot 3} - 2\,268\,530,07 = 54,37;$$

$$SS_{tot} = \sum (y^2) - K = 31915,93;$$

$$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block} = 31915,93 - 31785,93 - 54,37 = 75,63.$$

Таблица 27. – Сводная таблица дисперсионного анализа

Источник дисперсии	Число степеней свободы (f)	Сумма квадратов	Средний квадрат	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{\text{набл.}}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{\text{критич.}}$ ($p = 0,05$)
			$\frac{\text{Сумма квадратов}}{f}$		
Образцы	2	98,48	49,24		
Линейная регрессия	1	31684	31684	16764,02	>4,08
Непараллельность	2	3,17	1,59	0,84	<3,23
Нелинейность	3(3-2)=3	0,28	0,09	0,05	<2,84
Постановки	3·3-1=8	31785,93	3973,24		
Блоки	5	54,37	10,87	5,75	>2,45
Остаточная дисперсия	(3·3-1)(6-1)=40	75,63	1,89		
Итог (общая дисперсия)	6·3·3-1=53	31915,93	602,19		

Вычисление активности образца U:

$$b = \frac{\sum L}{\ln h \cdot (d - 1)} = \frac{1068}{\lg 2 \cdot 6 \cdot 3 \cdot (3 - 1)} = 98,55;$$

$$\bar{y}_s = \frac{3708}{3 \cdot 6} = 206;$$

$$\bar{y}_U = \frac{3655}{3 \cdot 6} = 203,05;$$

$$M_U = \frac{(\bar{y}_U - \bar{y}_s)}{b} = \frac{206 - 203,05}{98,55} = -0,02988;$$

$$A_U = 1000 \text{ ME/мг};$$

$$R_U = 1000 \cdot 10^{-0,02988} = 933,51 \text{ ME/мг};$$

Вычисление доверительных границ активности образца U:

$$s^2 = 1,89$$

$$t = 2,021 \text{ (при } f = 40)$$

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} = \frac{31684}{31684 - 1,89 \cdot 2,021^2} = 1,00024;$$

$\acute{c} = 4$ из таблицы 68

$$\begin{aligned}
 -\Delta &= C\acute{M}_U - \sqrt{(C - 1) \cdot (C\acute{M}_U^2 + \acute{c}I^2)} = \\
 &= 1,00024 \cdot (-0,02988) - \\
 &-\sqrt{(1,00024 - 1) \cdot (1,00024 \cdot (-0,02988)^2 + 4 \cdot lg2^2)} = -0,03923; \\
 +\Delta &= C\acute{M}_U + \sqrt{(C - 1) \cdot (C\acute{M}_U^2 + \acute{c}I^2)} = \\
 &= 1,00024 \cdot (-0,02988) + \\
 &+\sqrt{(1,00024 - 1) \cdot (1,00024 \cdot (-0,02988)^2 + 4 \cdot lg2^2)} = -0,02055;
 \end{aligned}$$

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: $1000 \cdot 10^{-0,03923}$ и $1000 \cdot 10^{-0,02055}$, т. е. 913,63 МЕ/мг и 953,78 МЕ/мг соответственно.

Аналогично вычисляют активность и доверительные границы для испытуемого образца Z. Полученные результаты представлены в таблице 28:

Таблица 28. – *Результаты оценки активностей испытуемых антибиотиков (МЕ/мг) и доверительные интервалы*

	Нижняя граница	Оценка	Верхняя граница
Образец U	913,63	933,51	953,78
Образец Z	974,80	996,10	1017,90

Следующий раздел приведён для информации

ПРИМЕР 6

Двухдозовый латинский квадрат для определения биологической активности окситоцина на изолированном органе.

При решении использованы формулы, приведённые в таблицах 5, 7 – 9.

При использовании в качестве экспериментального объекта изолированного рога матки крысы, помещённого в термостатируемую ванночку с питательным раствором, ответами являются величины изотонических сокращений после введения в равных объёмах двух концентраций стандартного образца и двух концентраций испытуемого образца окситоцина. Сокращения регистрируют в виде амплитуды перемещения писчика регистрирующего устройства или, в случае компьютеризированного прибора, автоматически регистрируют с помощью программного обеспечения. Порядок введения стандартного образца и испытуемого образца приведён в таблице 29.

Таблица 29. – Порядок введения доз стандартного образца и испытуемого образца окситоцина в ванночку

1.	s ₁	s ₂	u ₁	u ₂
2.	u ₂	s ₁	s ₂	u ₁
3.	u ₁	u ₂	s ₁	s ₂
4.	s ₂	u ₁	u ₂	s ₁

Таблица 30. – Ответы изолированного органа (см) на введение стандартного образца и испытуемого образца окситоцина

Строка	Столбцы				Сумма строк (R)	R ²
1.	6,50	12,45	9,75	12,50	R ₁ = 41,20	1697,44
2.	12,20	5,35	12,70	6,10	R ₂ = 36,35	1321,32
3.	6,40	12,30	5,25	12,85	R ₃ = 36,80	1354,24
4.	12,80	5,70	11,55	4,30	R ₄ = 34,35	1179,92
Сумма столбцов (C)	37,90	35,80	39,25	35,75		$\sum R^2 = 5552,925$
C ²	1436,41	1281,64	1540,56	1278,063	$\sum C^2 = 5536,675$	

Таблица 31. – Суммы ответов и контрасты

	Стандартный образец (S)	Испытуемый образец (U)	Сумма
Суммарный ответ от минимальной дозы	S ₁ =21,40	U ₁ =27,95	
Суммарный ответ от максимальной дозы	S ₂ =50,80	U ₂ =48,55	
Сумма	S=72,20	U=76,5	$\sum y = 148,70$
Линейный контраст	L _S =29,40	L _U =20,6	$\sum L = 50,00$

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N} = \frac{148,7^2}{16} = 1381,98;$$

$$SS_{prep} = \frac{S^2 + U^2}{2n} - K =$$

$$= \frac{72,2^2 + 76,5^2}{2 \cdot 4} - 1381,98 = 1,156;$$

$$SS_{reg} = \frac{(\sum L)^2}{2nh} = \frac{50,00^2}{2 \cdot 4 \cdot 2} = 156,25 = E;$$

$$SS_{par} = \frac{L_S^2 + L_U^2}{2n} - E =$$

$$= \frac{29,4^2 + 20,6^2}{2 \cdot 4} - 156,25 = 4,84;$$

$$SS_{treat} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + U_1^2 + U_2^2}{4} - K =$$

$$= \frac{21,4^2 + 50,8^2 + 27,95^2 + 48,55^2}{4} - 1381,98 = 162,246;$$

$$SS_{block} = \frac{R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + R_4^2}{hd} - K =$$

$$= \frac{5552,925}{2 \cdot 2} - 1381,98 = 6,25;$$

$$SS_{col} = \frac{C_1^2 + C_2^2 + C_3^2 + C_4^2}{hd} - K =$$

$$= \frac{5536,675}{2 \cdot 2} - 1381,98 = 2,19;$$

$$SS_{tot} = \sum (y^2) - K = 175,705;$$

$$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block} - SS_{col} =$$

$$= 175,705 - 162,246 - 6,25 - 2,19 = 5,02.$$

Таблица 32. – Сводная таблица дисперсионного анализа

Источник дисперсии	Число степеней свободы (f)	Сумма квадратов	Средний квадрат $\frac{\text{Сумма квадратов}}{f}$	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{набл.}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{критич.}$ ($p = 0,05$)
Образцы	1	1,156	1,156		
Линейная регрессия	1	156,250	156,250	186,75	>5,99
Непараллельность	1	4,840	4,840	5,78	<5,99
Постановки	2·2-1=3	162,246	54,082		
Строки	3	6,250	2,083	2,49	<4,76
Столбцы	3	2,190	0,730	0,872	<4,76

Остаточная дисперсия	$(2 \cdot 2 - 2)(4 - 1) = 6$	5,020	0,837		
Итог (общая дисперсия)	$4 \cdot 2 \cdot 2 - 1 = 15$	175,705	11,710		

Вычисление биологической активности:

$$b = \frac{\sum L}{Inh \cdot (d - 1)} = \frac{50}{lg2 \cdot 4 \cdot 2 \cdot (2 - 1)} = 20,76;$$

$$\bar{y}_s = \frac{72,2}{2 \cdot 4} = 9,025;$$

$$\bar{y}_U = \frac{76,5}{2 \cdot 4} = 9,563;$$

$$\dot{M}_U = \frac{(\bar{y}_U - \bar{y}_s)}{b} = \frac{9,563 - 9,025}{20,76} = 0,0259;$$

$$A_U = 5 \text{ МЕ/мл};$$

$$R_U = 5 \cdot 10^{0,0259} = 5,31 \text{ МЕ/мл};$$

Вычисление доверительных границ биологической активности:

$$s^2 = 0,837$$

$$t = 2,447 \text{ (при } f = 6)$$

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} = \frac{156,25}{156,25 - 0,837 \cdot 2,447^2} = 1,033;$$

$$c = 1 \text{ (из таблицы 68)}$$

$$-\Delta = C \dot{M}_U - \sqrt{(C - 1) \cdot (C \dot{M}_U^2 + c I^2)} =$$

$$= 1,033 \cdot 0,0259 -$$

$$-\sqrt{(1,033 - 1) \cdot (1,033 \cdot 0,0259^2 + 1 \cdot lg2^2)} = -0,0281;$$

$$+\Delta = C \dot{M}_U + \sqrt{(C - 1) \cdot (C \dot{M}_U^2 + c I^2)} =$$

$$= 1,033 \cdot 0,0259 +$$

$$+\sqrt{(1,033 - 1) \cdot (1,033 \cdot 0,0259^2 + 1 \cdot lg2^2)} = 0,0816.$$

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: $5 \cdot 10^{-0,0281}$ и $5 \cdot 10^{0,0816}$, т.е. 4,69 МЕ/мл и 6,03 МЕ/мл соответственно.

Следующий раздел приведён для информации

ПРИМЕР 7

Трёхдозовый латинский квадрат для определения активности антибиотика методом диффузии в агар в чашках Петри.

При решении использованы формулы, приведённые в таблицах 6 – 9.

Активность антибиотика определяли по зонам угнетения роста микроорганизмов. В каждую чашку Петри внесли по 3 раствора стандартного образца и 3 раствора испытуемого образца. Соотношение концентраций 1:1,5, т.е. $I = \lg 1,5$. В качестве ответа принимали диаметр зоны угнетения роста микроорганизмов в мм. Последовательность внесения растворов в лунки или цилиндры приведена в таблице 33.

Таблица 33. – Порядок внесения растворов стандартного образца и испытуемого образца антибиотика в чашки Петри

№ чашки	Концентрации растворов					
	s_1	s_2	s_3	u_1	u_2	u_3
1.	s_1	s_2	s_3	u_1	u_2	u_3
2.	u_3	s_1	s_2	s_3	u_1	u_2
3.	u_2	u_3	s_1	s_2	s_3	u_1
4.	u_1	u_2	u_3	s_1	s_2	s_3
5.	s_3	u_1	u_2	u_3	s_1	s_2
6.	s_2	s_3	u_1	u_2	u_3	s_1

Таблица 34. – Диаметр зоны угнетения роста микроорганизмов

Строка	Столбцы						Сумма строк (R)	R^2
1.	16,4	17,6	18,2	16,2	17,2	18,4	$R_1 = 104,0$	10816,00
2.	17,8	16,4	17,4	18,2	16,0	17,2	$R_2 = 103,0$	10609,00
3.	17,0	18,4	16,6	17,2	18,8	15,4	$R_3 = 103,4$	10691,56
4.	16,4	16,6	18,0	16,0	17,6	18,0	$R_4 = 102,6$	10526,76
5.	18,2	16,0	17,4	18,6	16,2	17,4	$R_5 = 103,8$	10774,44
6.	17,4	18,4	16,2	17,4	18,0	16,0	$R_6 = 103,4$	10691,56
Сумма столбцов (C)	103,2	103,4	103,8	103,6	103,8	102,4		$\sum R^2 = 64109,32$

C^2	10650,2 4	10691,5 6	10774,4 4	10732,9 6	10774,4 4	10485,7 6	$\sum C^2 =$ $= 64109,40$	
-------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	------------------------------	--

Таблица 35. – Суммы ответов и контрасты

	Стандартный образец (S)	Испытуемый образец (U)	Сумма
Суммарный ответ от минимальной дозы	$S_1=97,6$	$U_1=96,2$	
Суммарный ответ от второй дозы	$S_2=104,6$	$U_2=102,8$	
Суммарный ответ от максимальной дозы	$S_3=109,8$	$U_3=109,2$	
Сумма	$S=312,0$	$U=308,2$	$\sum y = 620,2$
Линейный контраст	$L_S=12,2$	$L_U=13,0$	$\sum L = 25,2$

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N} = \frac{620,2^2}{36} = 10684,6678;$$

$$SS_{prep} = \frac{S^2 + U^2}{3n} - K =$$

$$= \frac{312,0^2 + 308,2^2}{3 \cdot 6} - 10684,6678 = 0,4011;$$

$$SS_{reg} = \frac{(\sum L)^2}{2nh} = \frac{25,2^2}{2 \cdot 6 \cdot 2} = 26,46 = E;$$

$$SS_{par} = \frac{L_S^2 + L_U^2}{2n} - E =$$

$$= \frac{12,2^2 + 13,0^2}{2 \cdot 6} - 26,46 = 0,0267;$$

$$SS_{treat} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + U_1^2 + U_2^2 + U_3^2}{6} - K =$$

$$= \frac{97,6^2 + 104,6^2 + 109,8^2 + 96,2^2 + 102,8^2 + 109,2^2}{6} - 10684,6678 =$$

$$= 26,9789;$$

$$SS_{lin} = SS_{treat} - SS_{prep} - SS_{reg} - SS_{par} =$$

$$= 26,9789 - 0,4011 - 26,46 - 0,0267 = 0,0911;$$

$$SS_{block} = \frac{R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + R_4^2 + R_5^2 + R_6^2}{hd} - K =$$

$$= \frac{64109,32}{2 \cdot 3} - 10684,6678 = 0,2189;$$

$$SS_{col} = \frac{C_1^2 + C_2^2 + C_3^2 + C_4^2}{hd} - K =$$

$$= \frac{64109,40}{2 \cdot 3} - 10684,6678 = 0,2322;$$

$$SS_{tot} = \sum (y^2) - K = 10713,9600 - 10684,6678 = 29,2922;$$

$$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block} - SS_{col} =$$

$$= 29,2922 - 26,9789 - 0,2189 - 0,2322 = 1,8622.$$

Таблица 36. – Сводная таблица дисперсионного анализа

Источник дисперсии	Число степеней свободы (f)	Сумма квадратов	Средний квадрат Сумма квадратов f	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{набл.}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{критич.}$ ($p = 0,05$)
Образцы	1	0,4011	0,4011		
Линейная регрессия	1	26,4600	26,4600	284,18	>4,35
Непараллельность	1	0,0267	0,0267	0,2868	<4,35
Нелинейность	2(3-2)=2	0,0911	0,0456	0,4897	<3,49
Постановки	2·3-1=5	26,9789	5,39578		
Строки	5	0,2189	0,04378	0,4702	<2,71
Столбцы	5	0,2322	0,0464	0,4984	<2,71
Остаточная дисперсия	(2·3-2)(6-1)=20	1,8622	0,0931		
Итог (общая дисперсия)	6·2·3-1=35	29,2922	0,8369		

Вычисление активности:

$$b = \frac{\sum L}{lnh \cdot (d - 1)} = \frac{25,2}{lg1,5 \cdot 6 \cdot 2 \cdot (3 - 1)} = 5,9625;$$

$$\bar{y}_s = \frac{312,0}{3 \cdot 6} = 17,333;$$

$$\bar{y}_u = \frac{308,2}{3 \cdot 6} = 17,122;$$

$$\hat{M}_U = \frac{(\bar{y}_U - \bar{y}_S)}{b} = \frac{17,122 - 17,333}{5,9625} = -0,0354;$$

$$A_U = 1000 \text{ МЕ/мг};$$

$$R_U = 1000 \cdot 10^{-0,0354} = 921,722 \text{ МЕ/мг};$$

Вычисление доверительных границ активности:

$$s^2 = 0,09311$$

$$t = 2,086 \text{ (при } f = 20)$$

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} = \frac{26,46}{26,46 - 0,09311 \cdot 2,086^2} = 1,0156;$$

$$c = 8/3 \text{ (из таблицы 68)}$$

$$\begin{aligned} -\Delta &= C \hat{M}_U - \sqrt{(C - 1) \cdot (C \hat{M}_U^2 + c I^2)} = \\ &= 1,0156 \cdot (-0,0354) - \\ &-\sqrt{(1,0156 - 1) \cdot (1,0156 \cdot (-0,0354)^2 + 8/3 \cdot \lg 1,5^2)} = -0,07214; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} +\Delta &= C \hat{M}_U + \sqrt{(C - 1) \cdot (C \hat{M}_U^2 + c I^2)} = \\ &= 1,0156 \cdot (-0,0354) + \\ &+\sqrt{(1,0156 - 1) \cdot (1,0156 \cdot (-0,0354)^2 + 8/3 \cdot \lg 1,5^2)} = 0,00024. \end{aligned}$$

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: $1000 \cdot 10^{-0,07214}$ и $1000 \cdot 10^{0,00024}$, т. е. 846,95 МЕ/мг и 1000,55 МЕ/мг соответственно.

Следующий раздел приведён для информации

ПРИМЕР 8

Двухдозовая перекрёстная схема для определения биологической активности инсулина путём подкожной инъекции у кроликов.

Стандартный образец вводили в дозах 1 и 2 ЕД/мл. Эквивалентные дозы испытуемого образца неизвестной активности назначали исходя из предполагаемой активности 40 ЕД/мл. Кроликам подкожно вводили 0,5 мл соответствующих растворов в соответствии со схемой, приведённой в таблице 37.

Таблица 37. – Схема двойного перекреста

	ГРУППА 1	ГРУППА 2	ГРУППА 3	ГРУППА 4
I ПОСТАНОВКА (день I)	s ₁	s ₂	u ₁	u ₂
II ПОСТАНОВКА (день II)	u ₂	u ₁	s ₂	s ₁

Таблица 38. – Сумма ответов (содержание глюкозы в крови кроликов через 1 час и 2,5 часа) в мг/100 мл

	Группа 1			Группа 2			Группа 3			Группа 4		
	s ₁	u ₂	Среднее	s ₂	u ₁	Среднее	u ₁	s ₂	Среднее	u ₂	s ₁	Среднее
	112	104	108	65	72	68,5	105	91	98	118	144	131
	126	112	119	116	160	138	83	67	75	119	149	134
	62	58	60	73	72	72,5	125	67	96	42	51	46,5
	86	63	74,5	47	93	70	56	45	50,5	64	107	85,5
	52	53	52,5	88	113	100,5	92	84	88	93	117	105
	110	113	111,5	63	71	67	101	56	78,5	73	128	100,5
	116	91	103,5	50	65	57,5	66	55	60,5	39	87	63
	101	68	84,5	55	100	77,5	91	68	79,5	31	71	51
Среднее	95,6	82,8		69,6	93,3		89,9	66,6		72,4	106,8	

Для рассматриваемого дизайна испытания применение дисперсионного анализа является более сложным, чем для рассмотренных ранее дизайнов, потому что компонент дисперсии, обусловленный параллельностью, не является независимым от компонента дисперсии, обусловленного различием между кроликами. Поэтому проверка параллельности линий регрессий требует дополнительного введения второго поправочного коэффициента для ошибки среднего квадрата отклонений, который вычисляется путём вычитания компонента параллельности и пар «взаимодействующих» компонентов из компонента, связанного с различием между кроликами.

В результате в дисперсионном анализе необходимо учитывать три пары «взаимодействующих» компонентов: дни×образцы; дни×регрессия; дни×параллельность.

Эти коэффициенты характеризуют тенденцию компонентов к изменению в разные дни испытаний (в серии «изо дня в день»). Таким образом, соответствующие F-отношения

обеспечивают проверку этих компонентов. Если статистическая значимость полученных оценок F-отношений является высокой, следует с большой осторожностью интерпретировать результаты количественного определения и, если это возможно, необходимо повторить количественное определение биологической активности испытуемых образцов инсулина.

Несмотря на двухфазный дизайн испытания дисперсионный анализ проводят с использованием формул, приведённых в таблицах 3 и 4, отдельно как для каждого дня, так и для объединённого набора данных.

Таблица 39. – Средние ответы и линейные контрасты

	Стандартный образец (S)			Испытуемый образец (U)		
	1 день	2 день	1 день + 2 день	1 день	2 день	1 день + 2 день
Средний ответ от минимальной дозы	$S_1 = 95,625$	$S_1 = 106,75$	$S_1 = 101,1875$	$U_1 = 89,875$	$U_1 = 93,25$	$U_1 = 91,5625$
Средний ответ от максимальной дозы	$S_2 = 69,625$	$S_2 = 66,625$	$S_2 = 68,125$	$U_2 = 72,375$	$U_2 = 82,75$	$U_2 = 77,5625$
Сумма средних ответов	$P_S = 165,25$	$P_S = 173,38$	$P_S = 169,31$	$P_U = 162,25$	$P_U = 176$	$P_U = 169,125$
Линейный контраст	$L_S = -13$	$L_S = -20,06$	$L_S = -16,53$	$L_U = -8,75$	$L_U = -5,25$	$L_U = -7$

$$H_P(1 \text{ день}) = H_P(2 \text{ день}) = \frac{n}{d} = \frac{8}{2} = 4;$$

$$H_P(1 \text{ день} + 2 \text{ день}) = \frac{n}{d} = \frac{16}{2} = 8;$$

$$H_L(1 \text{ день}) = H_L(2 \text{ день}) = \frac{12n}{d^3 - d} = \frac{12 \cdot 8}{2^3 - 2} = 16;$$

$$H_L(1 \text{ день} + 2 \text{ день}) = \frac{12n}{d^3 - d} = \frac{12 \cdot 16}{2^3 - 2} = 32;$$

$$K(1 \text{ день}) = \frac{n(P_S + P_U)^2}{hd} = \frac{8 \cdot (165,25 + 162,25)^2}{2 \cdot 2} = 214512,5;$$

$$K(2 \text{ день}) = \frac{n(P_S + P_U)^2}{hd} =$$

$$= \frac{8 \cdot (173,38 + 176)^2}{2 \cdot 2} = 244132,7;$$

$$K(1 \text{ день} + 2 \text{ день}) = \frac{n(P_S + P_U)^2}{hd} =$$

$$= \frac{16 \cdot (169,31 + 169,125)^2}{2 \cdot 2} = 458160;$$

Используя формулы, приведенные в таблицах 1 и 2, получают следующие результаты:

$$SS_{prep}(1 \text{ день}) = H_p(P_S^2 + P_U^2) - K =$$

$$= 4(165,25^2 + 162,25^2) - 214512,5 = 18,00;$$

Аналогично находят $SS_{prep}(2 \text{ день})$ и $SS_{prep}(1 \text{ день} + 2 \text{ день})$.

$$SS_{reg}(1 \text{ день}) = \frac{1}{h} H_L(L_S + L_U)^2 =$$

$$= \frac{1}{2} \cdot 16 \cdot (-13 - 8,75)^2 = 3784,5;$$

Аналогично находят $SS_{reg}(2 \text{ день})$ и $SS_{reg}(1 \text{ день} + 2 \text{ день})$.

$$SS_{par}(1 \text{ день}) = H_L(L_S^2 + L_U^2) - SS_{reg} =$$

$$= 16((-13)^2 + (-8,75)^2) - 3784,5 = 144,5;$$

Аналогично находят $SS_{par}(2 \text{ день})$ и $SS_{par}(1 \text{ день} + 2 \text{ день})$.

Получают результаты, приведённые в таблице 40:

Таблица 40. – Промежуточные результаты дисперсионного анализа

	1 день	2 день	1 день + 2 день
SS_{prep}	18,000	13,781	0,141
SS_{reg}	3784,5	5125,8	8859,5
SS_{par}	144,5	1755,3	1453,5

Коэффициенты взаимодействия рассчитывают следующим образом:

$$SS_{days \times i} = SS_i(1 \text{ день}) + SS_i(2 \text{ день}) - SS_i(1 \text{ день} + 2 \text{ день})$$

Пользуясь формулой, представленной выше, получают:

$$SS_{days \times prep} = 18,000 + 13,781 - 0,141 = 31,64$$

$$SS_{days \times reg} = 3784,5 + 5125,8 - 8859,5 = 50,8$$

$$SS_{days \times par} = 144,5 + 1755,3 - 1453,5 = 446,3$$

Дополнительно, рассчитывают сумму квадратов отклонений вследствие дисперсии, обусловленной разными днями испытаний:

$$SS_{days} = \frac{1}{2}N(D_1^2 + D_2^2) - K(1 \text{ день} + 2 \text{ день})$$

$$D_1 = \frac{95,625 + 69,625 + 89,875 + 72,375}{4} = 81,875$$

$$D_2 = \frac{82,75 + 93,25 + 66,625 + 106,75}{4} = 87,34375$$

$$SS_{days} = \frac{1}{2} * 64 * (81,875^2 + 87,34375^2) - 458160 = 478,52$$

Также рассчитывают сумму квадратов отклонений вследствие различий между кроликами:

$$SS_{block} = 2 \sum B_i^2 - K(1 \text{ день} + 2 \text{ день})$$

где: B_i – среднее значение ответа в пересчете на одного кролика.

$$SS_{block} = 2(108^2 + 119^2 + \dots + 51^2) - 458160 = 39794,7$$

$$SS_{res(rabbits)} = SS_{block} - SS_{days \times prep} - SS_{days \times reg} - SS_{par} =$$

$$= 39794,7 - 31,6 - 50,8 - 1453,5 = 38258,8$$

$$SS_{tot} = \sum (y - \bar{y})^2 = 53423,2$$

$$SS_{res(exper.)} = SS_{tot} - SS_{prep} - SS_{reg} - SS_{days} - SS_{days \times par} - SS_{block} =$$

$$= 53423,2 - 0,14 - 8859,5 - 478,5 - 446,3 - 39794,7 = 3844,06$$

Таблица 41. – Сводная таблица дисперсионного анализа

Источник дисперсии	Число степеней свободы (f)	Сумма квадратов	Средний квадрат	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{набл.}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{критич.}$ (p = 0,05)
			$\frac{\text{Сумма квадратов}}{f}$		
Непараллельность	1	1453,5	1453,5	1,064	<4,16
Дни×образцы	1	31,64	31,64	0,023	<4,16
Дни×регрессия	1	50,8	50,8	0,037	<4,16

Остаточная дисперсия между кроликами	28	38 258,8	1366,4		
Кролики	31	39794,7	1283,7		
Образцы	1	0,14	0,14	0,001	<4,16
Регрессия	1	8859,5	8859,5	64,532	>4,16
Дни	1	478,5	478,5	3,485	<4,16
Дни×непараллельность	1	446,3	446,3	3,251	<4,16
Остаточная дисперсия без кроликов (дисперсия опыта)	28	3844,1	137,3		
Итог (общая дисперсия)	63	53423,2			

Вычисление биологической активности:

$$b = \frac{H_L \cdot (L_S + L_U)}{\ln h} =$$

$$= \frac{32 \cdot (-16,53 - 7)}{\ln 2 \cdot 16 \cdot 2} = -33,95;$$

$$M_U = \frac{P_U - P_S}{db} = \frac{169,13 - 169,31}{2 \cdot (-33,95)} = 0,00276;$$

$$A_U = 40 \text{ ЕД/мл}$$

$$R_U = A_U \cdot \exp(M_U) = 40 \cdot e^{0,00276} = 40,1 \text{ ЕД/мл};$$

Вычисление доверительных границ биологической активности:

$$s^2 = 137,3$$

$$t = 2,048 \text{ (при } f = 28)$$

$$C = \frac{SS_{reg}}{SS_{reg} - s^2 t^2} = \frac{8859,5}{8859,5 - 137,3 \cdot 2,048^2} = 1,0695;$$

$$V = \frac{SS_{reg}}{b^2 dn} = \frac{8859,5}{(-33,95)^2 \cdot 2 \cdot 16} = 0,2402;$$

$$\begin{aligned}
 +\Delta &= CM_U + \sqrt{(C-1) \cdot (C \cdot M_U^2 + 2V)} = \\
 &= 1,0695 \cdot 0,00276 + \sqrt{(1,0695 - 1) \times (1,0695 \times 0,00276^2 + 2 \cdot 0,2402)} = \\
 &= 0,18574;
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 -\Delta &= CM_U - \sqrt{(C-1) \cdot (C \cdot M_U^2 + 2V)} = \\
 &= 1,0695 \cdot 0,00276 - \sqrt{(1,0695 - 1) \times (1,0695 \times 0,00276^2 + 2 \cdot 0,2402)} = \\
 &= -0,17984;
 \end{aligned}$$

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: $40 \cdot e^{-0,17984}$ и $40 \cdot 10^{0,18574}$, т. е. 33,4 ЕД/мл и 48,2 ЕД/мл соответственно.

4.2.9. Пропущенные результаты (значения)

Если по какой-либо причине (ошибка в эксперименте, гибель животного), не связанной с испытанием, в некоторых из групп выпал один или несколько результатов, возможность выполнения точных расчётов остается, но формулы значительно усложняются и могут быть представлены только в рамках общих линейных моделей (см. раздел 8. *Общие линейные модели*). Тем не менее, существует приблизительный метод в котором простота сбалансированного плана сохраняется путём замены пропущенного результата рассчитанным значением. Потерю информации, учитывают следующим образом: число степеней свободы для общей суммы квадратов и дисперсии уменьшают на число потерянных результатов, а для вычисления отсутствующих значений используют одну из приведённых ниже формул. Следует иметь в виду, что этот метод является приблизительным, и предпочтение следует отдавать точным расчётам. Также категорически недопустима замена пропущенных результатов в случае испытаний без повторений.

Схема полной рандомизации. В данном случае пропущенное значение может быть заменено средним арифметическим всех других результатов в пределах одной дозы (вида воздействия).

Схема рандомизированных блоков. Пропущенное значение заменяют величиной y' , рассчитанной по формуле:

$$y' = \frac{nB' + kT' - G'}{(n-1)(k-1)}, \quad (1)$$

где: B' – сумма ответов для блока, содержащего пропущенное значение;

T' – сумма ответов на дозу с пропущенным значением;

G' – сумма всех ответов;

k – число образцов в испытании, включая стандартный образец, умноженное на количество доз в испытании (hd).

В случае если в примере 4 ответ на дозу s_1 в первом блоке отсутствует, пропущенное значение находят следующим образом:

$$B' = 20 + 14 + 20 = 54$$

$$T' = 15 + 15 + 15 = 45$$

$$G' = 275$$

$$y' = \frac{4 * 54 + 2 * 2 * 45 - 275}{(4 - 1)(2 * 2 - 1)} = 13,44$$

Таким образом, значение 13,44 ставят на место пропуска (вместо значения 12). Дальнейшие вычисления проводят также как в примере 4, но число степеней свободы для общей и для остаточной дисперсий заменяют на 14 и 8 соответственно (уменьшают на 1).

Схема латинского квадрата. Пропущенное значение y' рассчитывают по формуле:

$$y' = \frac{n(B' + C' + T') - 2G'}{(n - 1)(n - 2)}, \quad (2)$$

где: B' – сумма ответов в строке, содержащей пропущенное значение;
 C' – сумма ответов в столбце, содержащем пропущенное значение;
 T' – сумма ответов на дозу с пропущенным значением;
 G' – сумма всех ответов.

В случае если в примере 7 ответ на дозу s_1 в первой строке, первом столбце отсутствует, пропущенное значение находят следующим образом:

$$B' = 17,6 + 18,2 + 16,2 + 17,2 + 18,4 = 87,6$$

$$C' = 17,8 + 17 + 16,4 + 18,2 + 17,4 = 86,8$$

$$T' = 16,4 + 16,6 + 16,0 + 16,2 + 16,0 = 81,2$$

$$G' = 603,8$$

$$y' = \frac{6(87,6 + 86,8 + 81,2) - 2 * 603,8}{(6 - 1)(6 - 2)} = 16,3$$

Таким образом, значение 16,3 ставят на место пропуска (вместо значения 16,4). Дальнейшие вычисления проводят также как в примере 7, но число степеней свободы для общей и для остаточной дисперсий заменяют на 34 и 19 соответственно (уменьшают на 1).

Перекры́стная схема. При использовании перекры́стной схемы применение той или иной формулы для пропущенного значения зависит от конкретной комбинации доз.

Если потеряно более одного результата, могут быть использованы эти же формулы, при условии, что число замененных результатов меньше 5 % по отношению к общему числу данных в эксперименте. Приближения, используемые при этих заменах, и уменьшение степеней свободы на число потерянных данных, замененных таким образом, обычно являются удовлетворительными. Полученные результаты следует интерпретировать с большой осторожностью, особенно если пропущенные результаты наблюдаются в одном виде доз или блоке.

4.3. МОДЕЛЬ УГЛОВЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ

Данную модель применяют для определения активности некоторых лекарственных средств с помощью микробиологических испытаний.

По оси абсцисс откладывают значения доз. Начало оси координат соответствует нулевой дозе, значения доз возрастают слева направо. По оси ординат откладывают значения активности. Две линии, рассчитанные для стандартного и испытуемого образцов, исходя из предположения, что они пересекаются друг с другом в точке, соответствующей нулевой дозе, представляют собой зависимости «доза-ответ». На рисунке 3 показана модель угловых коэффициентов. В отличие от модели параллельных линий, значения доз не логарифмируют. Активность испытуемого образца характеризует соотношение угловых коэффициентов этих двух линий дозозависимости.

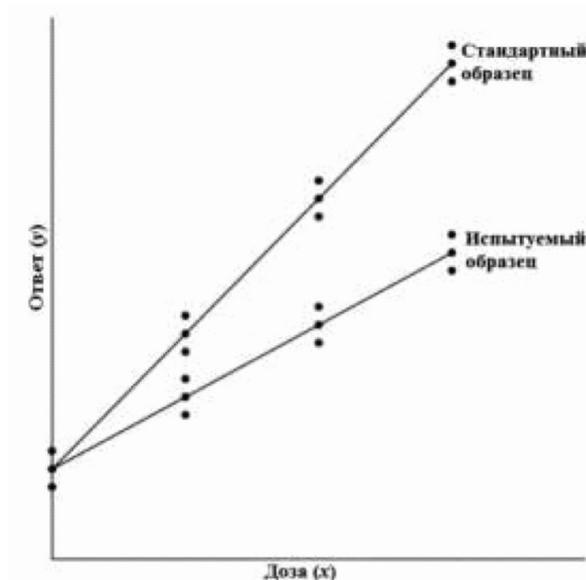


Рисунок 3. – Модель угловых коэффициентов.

Обычно предпочтительным является использование плана испытания с двумя дозами каждого образца и одной плацебо-группой. Однако рассчитанная линейная зависимость не всегда может наблюдаться вплоть до нулевой дозы. Если допустимо, можно

использовать план, не предполагающий проведение плацебо испытания. В этом случае предпочтительно использовать по три дозы каждого образца, так называемая «(3h)-дизайн с общей нулевой точкой». Эти дозы вводят следующим образом:

1) стандартный образец вводится в максимальной дозе, которая должна быть близка к наивысшей дозе, воспроизводящей средний ответ на линейном отрезке зависимости «доза-ответ», но не превышать её;

2) две другие дозы равномерно распределяются в промежутке между максимальной и нулевой дозами;

3) испытуемый образец вводится в соответствующих дозах, определённых исходя из предполагаемой активности вещества.

4.3.1. Дисперсионный анализ для испытаний с любым количеством доз при использовании модели угловых коэффициентов

Таблица 42. – *Формулы для испытаний с d дозами каждого из образцов при использовании модели угловых коэффициентов*

	Стандартный образец (S)	1-ый Испытуемый образец (U)	h-Испытуемый образец (T)
Средний ответ от минимальной дозы	S_1	U_1	T_1
Средний ответ от второй дозы	S_2	U_2	T_2
...	
Средний ответ от максимальной дозы	S_d	U_d	T_d
Сумма средних ответов	$P_S = S_1 + S_2 + \dots + S_d$	$P_U = U_1 + U_2 + \dots + U_d$	$P_T = \dots$
Линейный контраст	$L_S = 1S_1 + 2S_2 + \dots + dS_d$	$L_U = 1U_1 + 2U_2 + \dots + dU_d$	$L_T = \dots$
Свободные коэффициенты	$a_S = (4d + 2)P_S - 6L_S$	$a_U = (4d + 2)P_U - 6L_U$	$a_T = \dots$
Угловые коэффициенты	$b_S = 2L_S - (d + 1)P_S$	$b_U = 2L_U - (d + 1)P_U$	$b_T = \dots$
Коэффициенты постановки	$G_S = S_1^2 + S_2^2 + \dots + S_d^2$	$G_U = U_1^2 + U_2^2 + \dots + U_d^2$	$G_T = \dots$
Коэффициенты для показателя «Нелинейность»	$J_S = G_S - \frac{P_S^2}{d} - \frac{3b_S^2}{d^3 - d}$	$J_U = G_U - \frac{P_U^2}{d} - \frac{3b_U^2}{d^3 - d}$	$J_T = \dots$

Таблица 43. – *Дополнительные формулы для дисперсионного анализа*

Дизайн (hd+1)	$K = \frac{n(B + P_S + P_U + \dots)^2}{hd + 1}$	$H_B = \frac{nhd^2 - nhd}{hd^2 - hd + 4d + 2}$	$a = \frac{a_S + a_U + \dots}{h(d^2 - d)}$
Дизайн (hd)	$K = \frac{n(P_S + P_U + \dots)^2}{hd}$	—	
		$H_I = \frac{n}{4d^3 - 2d^2 - 2d}$	

Таблица 44. – Формулы для расчёта суммы квадратов и числа степеней свободы

Источник дисперсии	Степени свободы (f)		Сумма квадратов	
	Дизайн (hd+1)	Дизайн (hd)	Дизайн (hd+1)	Дизайн (hd)
Линейная регрессия	h		$SS_{reg} = SS_{treat} - SS_{blank} - SS_{int} - SS_{in}$	$SS_{reg} = SS_{treat} - SS_{int} - SS_{in}$
Контроль	1		$SS_{blank} = H_B(B - a)^2$	—
Точка пересечения	h-1		$SS_{int} = H_I((a_S^2 + a_U^2 + \dots) - h(d^2 - d)^2 a^2)$	
Нелинейность ^(*)	h(d-2)		$SS_{in} = n(J_S + J_U + \dots)$	
Постановки	hd	hd-1	$SS_{treat} = n(B^2 + G_S + G_U + \dots) - K$	$SS_{treat} = n(G_S + G_U + \dots) - K$

(*) Не рассчитывается для 2-ух дозовых испытаний.

Таблица 45. – Оценка остаточной дисперсии

Источник дисперсии	Степени свободы (f)		Сумма квадратов
	Дизайн (hd+1)	Дизайн (hd)	
Блоки (строки) ^(*)	n-1		$SS_{block} = hd(R_1^2 + \dots + R_n^2) - K$
Столбцы ^(**)	n-1		$SS_{col} = hd(C_1^2 + \dots + C_n^2) - K$
Остаточная дисперсия ^(***)	Полная рандомизация	hd(n-1)	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat}$
	Рандомизированный блок	hd(n-1)	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block}$
	Латинский квадрат	hd(n-1)	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block} - SS_{col}$
Общая дисперсия	nhd+n-1	nhd-1	$SS_{tot} = \sum (y - \bar{y})^2$

Для латинских квадратов эти формулы применимы только в том случае, если n = hd

(*) Не рассчитывается для схемы полной рандомизации.

(**) Рассчитывается только для схемы латинских квадратов. (***) Зависит от схемы рандомизации

Анализ валидности. Полученные данные должны соответствовать условиям 1, 2, 3, 4В, 5В (раздел 4.1. *Общие принципы*). Значимость различий дисперсий проверяют с помощью критерия Фишера. Обязательным является выполнение требований для показателей «Линейная регрессия», «Точка пересечения», «Нелинейность», а также «Контроль» (в случае дизайна (hd+1)). Для показателя «Линейная регрессия» наблюдаемое значение критерия Фишера должно быть больше критического, а для показателей «Точка пересечения», «Нелинейность» и «Контроль» - меньше критического ($p = 0,05$). Для того чтобы найти $F_{\text{набл.}}$ каждого из источников дисперсии средние квадраты каждого показателя делят на средний квадрат показателя «Отклонение». Полученные результаты сравнивают с табличными критическими значениями критерия Фишера – таблица 66.

4.3.2. Оценка активности и границ доверительных интервалов для испытаний с любым количеством доз при использовании модели угловых коэффициентов

После подтверждения валидности рассчитывают общий для всех линий свободный коэффициент:

$$\begin{array}{ll} \text{Дизайн (hd+1)} & \text{Дизайн (hd)} \\ \acute{a} = \frac{(2d+1)B + (2d-3)ha}{h(2d-3) + 2d+1} & \acute{a} = a = \frac{a_S + a_U + \dots}{h(d^2 - d)} \end{array}$$

Угловой коэффициент для стандартного образца рассчитывают по формуле:

$$\acute{b}_S = \frac{6L_S - 3d(d+1)\acute{a}}{2d^3 + 3d^2 + d}$$

Аналогично рассчитывают угловые коэффициенты для каждого из испытуемых образцов.

Отношение значения рассчитанной активности испытуемого образца (R_T) к значению заявленной активности испытуемого образца (A_T) вычисляют по формуле:

$$R_T = \frac{\acute{b}_T}{\acute{b}_S}$$

Рассчитанную активность испытуемого образца вычисляют по формуле:

$$R_T = R'_T \cdot A_T$$

Если шаг между соседними дозами не был одинаковым для стандартного и испытуемого образца, активность необходимо также домножить на I_S/I_T :

$$R_T = R'_T \cdot A_T \cdot \frac{I_S}{I_T}$$

В отличие от модели параллельных линий, антилогарифмы не вычисляют.

Вычисляют доверительный интервал для R'_T :

$$\pm\Delta = CR'_T - K' \pm \sqrt{(C-1) \cdot (CR'_T)^2 + 1) + K'(K' - 2CR'_T)}$$

где: $C = \frac{b'_S}{b'_S - s^2 t^2 V_1}$;

$$K' = (C-1)V_2;$$

t – критерий Стьюдента, см. таблицу 67 (при p = 0,05).

Таблица 46. – Вариация (V_1) и ковариация (V_2) числителя и знаменателя R_T

Дизайн (hd+1)	Дизайн (hd)
$V_1 = \frac{6}{n(2d+1)} \left(\frac{1}{d(d+1)} + \frac{3}{2(2d+1) + hd(d-1)} \right)$	$V_1 = \frac{6}{nd(2d+1)} \left(\frac{1}{d+1} + \frac{3}{h(d-1)} \right)$
$V_2 = \frac{3d(d+1)}{(3d+1)(d+2) + hd(d-1)}$	$V_2 = \frac{3(d+1)}{3(d+1) + h(d-1)}$

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: $A_T \cdot (-\Delta)$ и $A_T \cdot (+\Delta)$ соответственно.

Если шаг между соседними дозами не был одинаковым для стандартного образца и испытуемого образца, доверительные границы необходимо также домножить на I_S/I_T :

$$A_T \cdot (-\Delta) \cdot \frac{I_S}{I_T} \text{ и } A_T \cdot (+\Delta) \cdot \frac{I_S}{I_T}$$

Следующий раздел приведён для информации

ПРИМЕР 9

Модель угловых коэффициентов для определения активности вакцины против гриппа.

Содержание антигена гемагглютинина в двух вакцинах против гриппа определяли методом радиальной иммунодиффузии. На этикетках обеих вакцин была указана активность 15 мкг гемагглютинина на одну дозу, что соответствует содержанию 30 мкг гемагглютинина/мл. Стандартный образец имел аттестованную активность 39 мкг гемагглютинина/мл.

Исследовали 4 концентрации стандартного образца и испытуемого образца, рассчитанные, исходя из ожидаемых и обозначенных на этикетке значений активности; в каждом случае число повторов равно 2. Контрольную группу не использовали. После установления равновесия между внутренним и внешним реагентом, измеряли площадь кольцевых зон осадка. Результаты приведены в таблице 47.

Таблица 47. – Площадь кольцевых зон осадка

		y		Среднее	Сумма (C)	C ²
Группа 1	s ₁	18,0	18,0	18,00	36,0	1296,00
Группа 2	s ₂	22,8	24,5	23,65	47,3	2237,29
Группа 3	s ₃	30,4	30,4	30,40	60,8	3696,64
Группа 4	s ₄	35,7	36,6	36,15	72,3	5227,29
Группа 5	u ₁	15,1	16,8	15,95	31,9	1017,61
Группа 6	u ₂	23,1	24,2	23,65	47,3	2237,29
Группа 7	u ₃	28,9	27,4	28,15	56,3	3169,69
Группа 8	u ₄	34,4	37,8	36,10	72,2	5212,84
Группа 9	t ₁	15,4	15,7	15,55	31,1	967,21
Группа 10	t ₂	20,2	18,6	19,40	38,8	1505,44
Группа 11	t ₃	24,2	23,1	23,65	47,3	2237,29
Группа 12	t ₄	27,4	27,0	27,20	54,4	2959,36
					$\sum C = 595,7$	$\sum C^2 = 31763,95$

Таблица 48. – Средние ответы и контрасты

	Стандартный образец (S)	1-ый Испытуемый образец (U)	2-ой Испытуемый образец (T)
Средний ответ от минимальной дозы	S ₁ =18,00	U ₁ =15,95	T ₁ =15,55
Средний ответ от второй дозы	S ₂ =23,65	U ₂ =23,65	T ₂ =19,40
Средний ответ от третьей дозы	S ₃ =30,40	U ₃ =28,15	T ₃ =23,65
Средний ответ от максимальной дозы	S ₄ =36,15	U ₄ =36,10	T ₄ =27,20
Сумма средних ответов	P _S = 108,2	P _U = 103,9	P _T = 85,8
Линейный контраст	L _S = 301,1	L _U = 292,1	L _T = 234,1
Свободные коэффициенты	a _S = 141,0	a _U = 116,7	a _T = 139,8
Угловые коэффициенты	b _S = 61,2	b _U = 64,95	b _T = 39,2
Коэффициенты постановки	G _S = 3114,3	G _U = 2909,4	G _T = 1917,3

Коэффициенты для показателя «Нелинейность»	$J_S = 0,223$	$J_U = 2,227$	$J_T = 0,083$
--------------------------------------------	---------------	---------------	---------------

$$H_I = \frac{n}{4d^3 - 2d^2 - 2d} = \frac{2}{4 * 4^3 - 2 * 4^2 - 2 * 4} = 0,0093$$

$$a = \frac{a_S + a_U + a_T}{h(d^2 - d)} = \frac{141,0 + 116,7 + 139,8}{3(4^2 - 4)} = 11,0417$$

$$K = \frac{n(P_S + P_U + P_T)^2}{hd} = \frac{2(108,2 + 103,85 + 85,8)^2}{3 * 4} = 14785,7704$$

$$SS_{treat} = n(G_S + G_U + G_T) - K =$$

$$= 2(3114,3 + 2909,4 + 1917,3) - 14785,7704 = 1096,2296$$

$$SS_{int} = H_I((a_S^2 + a_U^2 + a_T^2) - h(d^2 - d)^2 a^2) =$$

$$= 0,0093((141,0^2 + 116,7^2 + 139,8^2) - 3(4^2 - 4)^2 * 11,0417^2) = 3,4862$$

$$SS_{lin} = n(J_S + J_U + J_T) = 2(0,223 + 2,227 + 0,083) = 5,0660$$

$$SS_{reg} = SS_{treat} - SS_{int} - SS_{lin} = 1096,2296 - 3,4862 - 5,0660 = 1087,6774$$

$$SS_{tot} = \sum (y - \bar{y})^2 = 1109,02$$

$$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} = 1109,02 - 1096,2296 = 12,7904$$

Таблица 49. – Сводная таблица дисперсионного анализа

Источник дисперсии	Число степеней свободы (f)	Сумма квадратов	Средний квадрат $\frac{\text{Сумма квадратов}}{f}$	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{\text{набл.}}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{\text{критич.}}$ ($p = 0,05$)
Линейная регрессия	3	1087,6774	362,5591	340,1436	>3,49
Точка пересечения	2	3,4862	1,7431	1,6353	<3,89
Нелинейность	$3(4-2)=6$	5,0660	0,8443	0,7921	<3,00
Постановки	$3 \cdot 4 - 1 = 11$	1096,2296	99,6572		
Остаточная дисперсия	$3 \cdot 4(2-1) = 12$	12,7904	1,0659		
Итог (общая дисперсия)	$2 \cdot 3 \cdot 4 - 1 = 23$	1109,0200	48,2183		

$$\hat{a} = a = 11,0417$$

Вычисление активности:

$$b'_S = \frac{6L_S - 3d(d+1)a}{2d^3 + 3d^2 + d} = \frac{6 \cdot 301,1 - 3 \cdot 4(4+1) \cdot 11,0417}{2 \cdot 4^3 + 3 \cdot 4^2 + 4} = 6,3561$$

$$b'_U = \frac{6L_U - 3d(d+1)a}{2d^3 + 3d^2 + d} = \frac{6 \cdot 292,1 - 3 \cdot 4(4+1) \cdot 11,0417}{2 \cdot 4^3 + 3 \cdot 4^2 + 4} = 6,0561$$

$$b'_T = \frac{6L_T - 3d(d+1)a}{2d^3 + 3d^2 + d} = \frac{6 \cdot 234,1 - 3 \cdot 4(4+1) \cdot 11,0417}{2 \cdot 4^3 + 3 \cdot 4^2 + 4} = 4,1228$$

$$R'_U = \frac{b'_U}{b'_S} = \frac{6,0561}{6,3561} = 0,9528$$

$$R'_T = \frac{b'_T}{b'_S} = \frac{4,1228}{6,3561} = 0,6486$$

$$A_T = A_U = 30 \text{ мкг/мл}$$

$$R_U = R'_U \cdot A_U = 0,9528 \cdot 30 = 28,5840 \text{ мкг/мл}$$

$$R_T = R'_T \cdot A_T = 0,6486 \cdot 30 = 19,4580 \text{ мкг/мл}$$

Вычисление доверительных границ активности:

$$V_1 = \frac{6}{nd(2d+1)} \left(\frac{1}{d+1} + \frac{3}{h(d-1)} \right) =$$

$$= \frac{6}{2 \cdot 4(2 \cdot 4 + 1)} \left(\frac{1}{4+1} + \frac{3}{3(4-1)} \right) = 0,0444$$

$$V_2 = \frac{3(d+1)}{3(d+1) + h(d-1)} = \frac{3(4+1)}{3(4+1) + 3(4-1)} = 0,625$$

$$C = \frac{b'^2_S}{b'^2_S - s^2 t^2 V_1} = \frac{6,3561^2}{6,3561^2 - 1,0659^2 \cdot 2,1788^2 \cdot 0,0444} = 1,00596$$

$$K' = (C - 1)V_2 = (1,00596 - 1) \cdot 0,625 = 0,0037$$

Для образца U:

$$-\Delta = CR'_U - K' - \sqrt{(C-1) \cdot (CR'^2_U + 1) + K'(K' - 2CR'_U)} =$$

$$= 1,00596 \cdot 0,9528 - 0,0037 -$$

$$-\sqrt{(1,00596 - 1) \cdot (1,00596 \cdot 0,9528^2 + 1) + 0,0037(0,0037 - 2 \cdot 1,00596 \cdot 0,9528)} =$$

$$= 0,8890$$

$$+\Delta = CR'_U - K' + \sqrt{(C-1) \cdot (CR'^2_U + 1) + K'(K' - 2CR'_U)} =$$

$$= 1,00596 \cdot 0,9528 - 0,0037 +$$

$$+\sqrt{(1,00596 - 1) \cdot (1,00596 \cdot 0,9528^2 + 1) + 0,0037(0,0037 - 2 \cdot 1,00596 \cdot 0,9528)} =$$

$$= 1,0205$$

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: 30·0,8890 и 30·1,0205, т. е. 26,67 мкг/мл и 30,62 мкг/мл соответственно.

Для образца Т:

$$\begin{aligned}
 -\Delta &= CR'_T - K - \sqrt{(C - 1) \cdot (CR'_T)^2 + 1) + K'(K' - 2CR'_T)} = \\
 &= 1,00596 \cdot 0,6486 - 0,0037 - \\
 &-\sqrt{(1,00596 - 1) \cdot (1,00596 \cdot 0,6486^2 + 1) + 0,0037(0,0037 - 2 \cdot 1,00596 \cdot 0,6486)} = \\
 &= 0,5882 \\
 +\Delta &= CR'_T - K + \sqrt{(C - 1) \cdot (CR'_T)^2 + 1) + K'(K' - 2CR'_T)} = \\
 &= 1,00596 \cdot 0,6486 - 0,0037 + \\
 &+\sqrt{(1,00596 - 1) \cdot (1,00596 \cdot 0,6486^2 + 1) + 0,0037(0,0037 - 2 \cdot 1,00596 \cdot 0,6486)} = \\
 &= 0,7093
 \end{aligned}$$

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: 30·0,5882 и 30·0,7093, т. е. 17,65 мкг/мл и 21,28 мкг/мл соответственно.

4.4. ЧЕТЫРЁХПАРАМЕТРИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ S-ОБРАЗНОЙ КРИВОЙ

Эту модель используют, когда требуется анализ вытянутых кривых «доза-ответ», модель показана на рисунке 4.

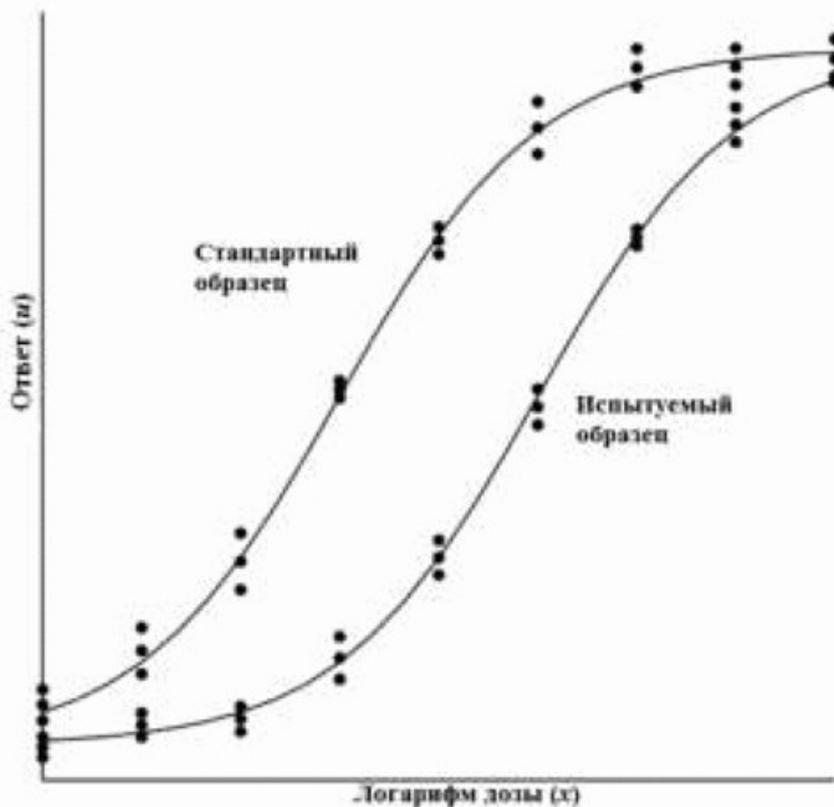


Рисунок 4. – Четырёхпараметрическая модель s-образной кривой.

Логарифмы доз откладывают на горизонтальной оси, начиная слева направо с минимальной концентрации и заканчивая максимальной. Величины ответов откладывают на вертикальной оси. Для стандартного образца и испытуемого образца строят кривые зависимости ответов от натурального логарифма дозы «ln(доза)-ответ». Общую форму кривых обычно описывают логистической функцией, но возможны и другие. Каждую кривую можно охарактеризовать 4 параметрами, поэтому данная модель часто называется четырёхпараметрической. Математическое представление кривой зависимости ответов от натурального логарифма дозы выглядит следующим образом:

$$u = \delta + \frac{\alpha - \delta}{1 + e^{-\beta(x-\gamma)}}$$

где: α – верхняя асимптота;

δ – нижняя асимптота;

β – угол наклона;

γ – расстояние (горизонтальное смещение) между кривыми.

Для валидного испытания необходимо, чтобы кривые стандартного образца и испытуемого образца имели одинаковый угол наклона, максимальный и минимальный уровни ответа в крайних частях кривых. У кривых может различаться только положение в пространстве, характеризующееся расстоянием между кривыми – γ . Горизонтальное смещение между кривыми связано с «истинной активностью» испытуемого образца. При рутинном проведении испытаний проверку условий равенства верхнего и нижнего уровней достаточно проводить на стадии разработки методики, а затем через равные установленные промежутки времени регулярно проверять выполнение данного условия. Проверку также необходимо повторять при изменении используемых материалов или условий проведения испытаний.

Альтернативные подходы:

1) если имеется «приемлемая» оценка верхнего (α) и нижнего пределов (δ), то для всех образцов выбирают дозы со средним значением ответа (u), приблизительно попадающим в диапазон от 20 % до 80 % максимальной величины пределов. Преобразуют ответы, возникающие при введении выбранных доз, по формуле:

$$y = \ln\left(\frac{u - \delta}{\alpha - u}\right)$$

Затем для анализа используют модель параллельных линий.

2) отбирают диапазон доз, для которых ответы (u) или соответствующим образом преобразованные ответы, например, $\ln(u)$, являются приближенно линейными при

построении графика зависимости ответов от натурального логарифма дозы. Затем для анализа применяют модель параллельных линий.

5. -ИСПЫТАНИЯ, ОСНОВАННЫЕ НА КАЧЕСТВЕННЫХ ОТВЕТАХ

В ряде случаев невозможно или слишком трудоёмко количественно оценить ответ каждого экспериментального объекта. В то же время, такие качественные ответы как смерть или жизнь, наличие или отсутствие симптомов гипогликемии и др. представляют собой дихотомические ответы. Результат испытания будет зависеть от количества объектов, для которых такой ответ наступил.

В отличие от подраздела 4.1. *Модель параллельных линий*, вместо n индивидуальных ответов для каждой дозы записывают одно значение, т. е. процент объектов, у которых проявился эффект в каждой испытываемой группе. Если эти результаты представить в виде графика зависимости доли прореагировавших объектов от логарифма дозы, получим не линейную, а сигмоидную (s-образную) кривую. Для анализа сигмоидной кривой «доза-ответ» применяют математическую функцию, описывающую данную кривую. Обычно используют кумулятивную функцию нормального распределения (характеристическую кривую). Если результаты связаны с процессами роста, предпочтительной является логистическая функция распределения, хотя различие в результатах, полученных при использовании этих двух функций, как правило, незначительно.

Максимально правдоподобное оценивание угловых коэффициентов и расположения кривых может быть получено только при использовании итерационных процедур. Существует множество таких статистических процедур, которые приводят к одинаковым результатам, но отличаются по эффективности вследствие разной скорости конвергенции. Одним из наиболее быстрых методов является метод прямой оптимизации функции максимальной правдоподобности (см. раздел 8. *Общие линейные модели*). Этот метод можно легко выполнить при помощи компьютерного программного обеспечения, имеющего соответствующую встроенную функцию.

Методика, приведённая ниже, не является самой быстрой, но достаточно проста по сравнению с другими методиками. Эта методика может применяться для количественных определений, в которых один или более испытуемых образцов сравниваются со стандартным образцом. Кроме этого, должны выполняться следующие условия:

1) зависимость между логарифмом дозы и полученным ответом должна быть представлена в виде кумулятивной кривой нормального распределения (характеристическая кривая);

2) кривые для стандартного образца и испытуемого образца должны быть параллельны, т. е. иметь одинаковую форму, и могут различаться только расположением по оси абсцисс;

3) теоретически не должно наблюдаться ответа от введения чрезвычайно малой дозы, и невозможно отсутствие ответа от введения чрезвычайно большой дозы.

5.1. ПРОБИТ МЕТОД

Сигмоидную кривую можно преобразовать в прямую путём замены каждой доли положительных ответов в группе соответствующими значениями кумулятивного нормального распределения. Применять метод параллельных линий после линеаризации результатов нельзя, так как для каждой дозы не выполняется условие однородности дисперсий. Дисперсия минимальна, если пробит равен нулю и возрастает как для положительных, так и для отрицательных значений пробита. Следовательно, необходимо придать больший вес значениям в средней части кривой и меньший ее крайним частям. Ниже приведено описание такого метода, а также процедура дисперсионного анализа, оценка активности и границ доверительного интервала.

В таблицу 50 заносят данные по столбцам, номера которых обозначают следующее:

- (1) доза стандартного или испытуемого образца;
- (2) число n объектов, подвергшихся испытанию;
- (3) число r объектов с положительным ответом на введение данной дозы;
- (4) логарифм x дозы;
- (5) доля положительных ответов $p=r/n$ в группе.

Далее начинается первый цикл:

- (6) столбец Y при первой итерации заполняют нулями;
- (7) соответствующие значения $\Phi=\Phi(Y)$ функции кумулятивного стандартного (характеристической кривой) распределения (Таблица 69).

Значения, заносимые в столбцы (8)–(10), вычисляют по формулам:

$$(8) \quad Z = \frac{e^{-Y^2/2}}{\sqrt{2\pi}} \quad (3)$$

$$(9) \quad y = Y + \frac{p - \Phi}{Z} \quad (4)$$

$$(10) \quad w = \frac{nZ^2}{\Phi - \Phi^2} \quad (5)$$

Значения wx , wy , wx^2 , wy^2 и wxy , заносимые в столбцы (11)–(15), вычисляют при помощи данных в столбцах (4), (9) и (10), затем вычисляют сумму (Σ) этих значений для

каждого из образцов. Полученные результаты суммирования переносят из таблицы 50 в столбцы (1)–(6) таблицы 51, а значения, заносимые в 6 дополнительных столбцов таблицы 51 с (7) по (12), вычисляют следующим образом:

$$(7) \quad S_{xx} = \sum wx^2 - \frac{(\sum wx)^2}{\sum w} \quad (6)$$

$$(8) \quad S_{xy} = \sum wxy - \frac{(\sum wx)(\sum wy)}{\sum w} \quad (7)$$

$$(9) \quad S_{yy} = \sum wy^2 - \frac{(\sum wy)^2}{\sum w} \quad (8)$$

$$(10) \quad \bar{x} = \frac{\sum wx}{\sum w} \quad (9)$$

$$(11) \quad \bar{y} = \frac{\sum wy}{\sum w} \quad (10)$$

$$b = \frac{\sum S_{xy}}{\sum S_{xx}} \quad (11)$$

$$(12) \quad a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (12)$$

Значения, приведённые в столбце (6) первой рабочей таблицы, теперь заменяют на значения $Y=a+bx$ и повторяют цикл вычислений до тех пор, пока разница между двумя последовательными циклами не станет достаточно малой (например, максимальная разница Y между двумя соседними циклами будет меньше 10^{-8}).

Таблица 50. – Первая рабочая таблица

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
	dose	n	r	x	p	Y	Φ	Z	y	w	wx	wy	wx^2	wy^2	wxy
S

										$\Sigma=$	$\Sigma=$	$\Sigma=$	$\Sigma=$	$\Sigma=$	$\Sigma=$
T

										$\Sigma=$	$\Sigma=$	$\Sigma=$	$\Sigma=$	$\Sigma=$	$\Sigma=$
etc.															

Таблица 51. – Вторая рабочая таблица

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
	Σw	Σwx	Σwy	Σwx^2	Σwy^2	Σwxy	S_{xx}	S_{xy}	S_{yy}	\bar{x}	\bar{y}	a
S
T
etc.
							$\Sigma=$	$\Sigma=$				

5.1.1. Анализ валидности

Перед вычислением активности и границ доверительного интервала оценивают валидность испытания. Если для каждого из образцов было проведено исследование не менее чем 3 доз, то отклонение от линейности рассчитывают следующим образом: к таблице 51 добавляют тринадцатый столбец и заполняют его значениями:

$$S_{yy} - \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}}$$

Сумма полученных значений является мерой отклонения от линейности и приблизительно подчиняется χ^2 -распределению со степенями свободы, равными $N-2h$. Значимость вычисленной величины можно оценить при помощи таблицы 70 или соответствующей функции компьютерного программного обеспечения. Если при уровне значимости 0,05 рассчитанная величина является значимой, результаты количественного определения следует отклонить. Если не выявлено значимого отклонения от линейной регрессии, проверяют отклонение от параллельности при уровне значимости 0,05, для чего рассчитывают значение при числе степеней свободы, равном $h-1$:

$$\chi^2 = \sum \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}} - \frac{(\sum S_{xy})^2}{\sum S_{xx}}$$

5.1.2. Вычисление активности

Натуральный логарифм отношения значения рассчитанной активности испытуемого образца (R_T) к значению заявленной активности испытуемого образца (A_T) вычисляют по формуле:

$$M_T = \frac{a_T - a_S}{b}$$

Рассчитанную активность испытуемого образца вычисляют по формуле:

$$R_T = A_T \cdot \exp(M_T)$$

Вычисляют доверительный интервал для полученного значения:

$$+\Delta = C \cdot M_T - (C - 1)(\bar{x}_S - \bar{x}_T) + \sqrt{(C - 1)(V \sum S_{xx} + C(M_T - \bar{x}_S + \bar{x}_T)^2)}$$

$$-\Delta = C \cdot M_T - (C - 1)(\bar{x}_S - \bar{x}_T) - \sqrt{(C - 1)(V \sum S_{xx} + C(M_T - \bar{x}_S + \bar{x}_T)^2)}$$

где: $C = \frac{b^2 \sum S_{xx}}{b^2 \sum S_{xx} - s^2 t^2}$;

$$s^2 = 1;$$

$$t = 1,96;$$

$$V = \frac{1}{\sum_S w} + \frac{1}{\sum_T w}.$$

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: $A_T \cdot e^{-\Delta}$ и $A_T \cdot e^{+\Delta}$ соответственно.

Следующий раздел приведён для информации

ПРИМЕР 10

Количественное определение активности вакцины против дифтерии *in vivo*.

Выполняли количественное определение вакцины против дифтерии (предполагаемая активность 140 МЕ/флакон) по отношению к стандартному образцу (аттестованная активность 132 МЕ/флакон). На основании этих данных готовили эквивалентные дозы и вводили случайным образом группам морских свинок. Через определённый период времени после введения образца животным вводили дифтерийный токсин, что вызывало гибель животных. Подсчитывали число выживших свинок. Полученные результаты приведены в таблице 52.

Таблица 52. – *Исходные данные, полученные при количественном определении активности вакцины для профилактики дифтерии методом летальной пробы у морских свинок*

Доза (МЕ/мл)	Стандартный образец (S) аттестованная активность 132 МЕ/флакон		Испытуемый образец (Т) предполагаемая активность 140 МЕ/флакон	
	Количество подопытных свинок	Количество выживших свинок	Количество подопытных свинок	Количество выживших свинок
1,0	12	0	11	0
1,6	12	3	12	4
2,5	12	6	11	8
4,0	11	10	11	10

Затем эти результаты переносили в первую рабочую таблицу, остальные её столбцы заполняли в соответствии с рекомендациями, приведёнными в подразделе 6.1. *Пробит метод*. В таблице 53 приведены результаты первого цикла процедуры итерационного анализа. Далее суммируют данные последних шести столбцов для каждого из образцов и результаты заносят во вторую рабочую таблицу 54. Остальные столбцы заполняют данными, полученными при использовании формул 6–12. Далее значения Y первой рабочей таблицы заменяют значениями $a+bx$ и выполняют второй цикл, получая таблицу 55. Циклы

повторяют до тех пор, пока разница между результатами двух последовательных циклов не станет достаточно маленькой. В результате получают таблицу 56.

Таблица 53. – Первая рабочая таблица первого цикла

Вакцина	Доза	n	r	x	p	Y	Φ	Z	y	w	wx	wy	wx ²	wy ²	wxy
S	1,0	12	0	0,000	0,000	0	0,5	0,399	-1,253	7,64	0,00	-9,57	0,00	12,00	0,00
	1,6	12	3	0,470	0,250	0	0,5	0,399	-0,627	7,64	3,59	-4,79	1,69	3,00	-2,25
	2,5	12	6	0,916	0,500	0	0,5	0,399	0,000	7,64	7,00	0,00	6,41	0,00	0,00
	4,0	11	10	1,386	0,909	0	0,5	0,399	1,025	7,00	9,71	7,18	13,46	7,36	9,95
										Σ=	Σ=	Σ=	Σ=	Σ=	Σ=
										29,92	20,30	-7,18	21,56	22,36	7,70
T	1,0	11	0	0,000	0,000	0	0,5	0,399	-1,253	7,00	0,00	-8,78	0,00	11,00	0,00
	1,6	12	4	0,470	0,333	0	0,5	0,399	-0,418	7,64	3,59	-3,19	1,69	1,33	-1,50
	2,5	11	8	0,916	0,727	0	0,5	0,399	0,570	7,00	6,42	3,99	5,88	2,27	3,66
	4,0	11	10	1,386	0,909	0	0,5	0,399	1,025	7,00	9,71	7,18	13,46	7,36	9,95
										Σ=	Σ=	Σ=	Σ=	Σ=	Σ=
										28,65	19,72	-0,80	21,03	21,97	12,11

Таблица 54. – Вторая рабочая таблица первого цикла

Вакцина	Σw	Σwx	Σwy	Σwx ²	Σmy ²	Σmxy	S _{xx}	S _{xy}	S _{yy}	\bar{x}	\bar{y}	a
S	29,92	20,30	-7,18	21,56	22,36	7,70	7,79	12,58	20,64	0,68	-0,24	-1,36
T	28,65	19,72	-0,80	21,03	21,97	12,11	7,46	12,66	21,95	0,69	-0,03	-1,17
							Σ=	Σ=				
							15,25	25,24				

Таблица 55. – Первая рабочая таблица второго цикла

Вакцина	Доза	n	r	x	p	Y	Φ	Z	y	w	wx	wy	wx ²	wy ²	wxy
S	1,0	12	0	0,000	0,000	-1,36	0,086	0,158	-1,911	3,77	0,00	-7,21	0,00	13,79	0,00
	1,6	12	3	0,470	0,250	-0,58	0,279	0,336	-0,672	6,74	3,17	-4,53	1,49	3,04	-2,13
	2,5	12	6	0,916	0,500	0,15	0,561	0,394	-0,001	7,57	6,94	-0,01	6,36	0,00	-0,01
	4,0	11	10	1,386	0,909	0,93	0,824	0,258	1,260	5,07	7,03	6,39	9,75	8,05	8,86
										Σ=	Σ=	Σ=	Σ=	Σ=	Σ=
										18,37	14,80	-2,14	14,85	17,81	5,28
T	1,0	11	0	0,000	0,000	-1,17	0,122	0,202	-1,769	4,20	0,00	-7,43	0,00	13,14	0,00
	1,6	12	4	0,470	0,333	-0,39	0,349	0,370	-0,430	7,23	3,40	-3,11	1,60	1,34	-1,46
	2,5	11	8	0,916	0,727	0,35	0,637	0,375	0,591	6,70	6,14	3,96	5,62	2,34	3,63
	4,0	11	10	1,386	0,909	1,13	0,870	0,211	1,311	4,35	6,03	5,70	8,36	7,48	7,90
										Σ=	Σ=	Σ=	Σ=	Σ=	Σ=
										Σ=	Σ=	Σ=	Σ=	Σ=	Σ=

Таблица 57. – Результаты анализа валидности

Вакцина	S_{xx}	S_{xy}	$\frac{S_{xy}^2}{S_{xx}}$	S_{yy}	$\chi_{lin}^2(S_{yy} - \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}})$
S	2,93	7,00	16,72	17,56	0,84
T	2,96	7,15	17,27	18,34	1,07
	$\Sigma=5,89$	$\Sigma=14,15$	$\Sigma=33,99$		$\Sigma=1,91$

Из таблицы 70 следует, что χ_{crit}^2 (при $df = k2h = 8 \cdot 2 \cdot 2 = 4$, $p = 0,05$) = 9,488. Таким образом, $\chi_{lin}^2 < \chi_{crit}^2$, следовательно, значительных отклонений от линейности не наблюдается.

Проверяют отклонение от параллельности:

$$\chi_{par}^2 = \sum \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}} - \frac{(\sum S_{xy})^2}{\sum S_{xx}} = 33,99 - \frac{14,15^2}{5,89} = 0,001$$

Из таблицы 70 следует, что χ_{crit}^2 (при $df = h-1 = 2-1 = 1$, $p = 0,05$) = 3,841. Таким образом, $\chi_{par}^2 < \chi_{crit}^2$, следовательно, значительных отклонений от параллельности не наблюдается.

Вычисление биологической активности:

$$b = \frac{\sum S_{xy}}{\sum S_{xx}} = \frac{14,15}{5,89} = 2,40$$

$$M_T = \frac{a_T - a_S}{b} = \frac{-1,72 - (-2,05)}{2,40} = 0,137$$

$$A_T = 140 \text{ ME/флакон}$$

$$R_T = A_T \cdot \exp(M_T) = 140 \cdot e^{0,137} = 160,6 \text{ ME/флакон}$$

Вычисление доверительных границ биологической активности:

$$s^2 = 1$$

$$t = 1,96$$

$$C = \frac{b^2 \sum S_{xx}}{b^2 \sum S_{xx} - s^2 t^2} = \frac{2,40^2 \cdot 5,89}{2,40^2 \cdot 5,89 - 1^2 \cdot 1,960^2} = 1,127$$

$$V = \frac{1}{\sum_S w} + \frac{1}{\sum_T w} = \frac{1}{18,37} + \frac{1}{17,96} = 0,110$$

$$\begin{aligned} +\Delta &= C \cdot M_T - (C - 1)(\bar{x}_S - \bar{x}_T) + \sqrt{(C - 1) \left(V \sum S_{xx} + C(M_T - \bar{x}_S + \bar{x}_T)^2 \right)} = \\ &= 1,127 \cdot 0,137 - (1,127 - 1)(0,81 - 0,7) + \\ &+ \sqrt{(1,127 - 1)(0,110 \cdot 5,89 + 1,127(0,137 - 0,81 + 0,70)^2)} = 0,43 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 -\Delta &= C \cdot M_T - (C - 1)(\bar{x}_S - \bar{x}_T) - \sqrt{(C - 1) \left(V \sum S_{xx} + C(M_T - \bar{x}_S + \bar{x}_T)^2 \right)} = \\
 &= 1,127 \cdot 0,137 - (1,127 - 1)(0,81 - 0,7) - \\
 &= -\sqrt{(1,127 - 1)(0,110 \cdot 5,89 + 1,127(0,137 - 0,81 + 0,70)^2)} = -0,146
 \end{aligned}$$

Нижняя и верхняя доверительная границы равны: $140 \cdot e^{-0,146}$ и $140 \cdot e^{0,43}$, т. е. 121 МЕ/флакон и 215,2 МЕ/флакон соответственно.

5.2. ЛОГИТ МЕТОД

В некоторых случаях логит метод является более подходящим. Название метода происходит от функции логит-преобразования, которая является обратной функции логистического распределения. Процедура в этом случае аналогична описанной для пробит метода, за исключением двух формул для расчёта значений Φ и Z :

$$\begin{aligned}
 \Phi &= \frac{1}{1 + e^{-Y}} \\
 Z &= \frac{e^{-Y}}{(1 + e^{-Y})^2}
 \end{aligned}$$

5.3. ЭФФЕКТИВНАЯ ДОЗА

Для определения эффективной дозы ED₅₀, т. е. дозы, положительный ответ на которую дают 50 % экспериментальных объектов (медианы), применяют пробит метод. Поскольку при этом нет необходимости сравнивать эту дозу со стандартным образцом, формулы несколько отличаются. Однако стандартный образец может применяться при использовании данного метода с целью проверки валидности испытания. Обычно испытание считают валидным, если рассчитанное значение ED₅₀ для стандартного образца достаточно близко к аттестованному значению ED₅₀. Значение термина «достаточно близко» зависит от требований, предъявляемых к испытаниям конкретного лекарственного средства.

Подготовка рабочих таблиц и проверка линейности описаны в подразделе 6.1. *Пробит метод*. Проверка параллельности для данного типа испытания не требуется. Значение ED₅₀ для испытуемого образца Т (и аналогично для других испытуемых образцов) рассчитывают, как описано в подразделе 6.1. *Пробит метод*. Для вычисления доверительных границ активности используют следующие формулы:

$$M_T = \frac{-a_T}{b}$$

Вычисляют верхнюю доверительную границу:

$$+\Delta = CM_T - (C - 1)\bar{x}_T + \sqrt{(C - 1)(V \sum S_{xx} + C(M_T - \bar{x}_T)^2)}$$

Вычисляют нижнюю доверительную границу:

$$-\Delta = CM_T - (C - 1)\bar{x}_T - \sqrt{(C - 1)(V \sum S_{xx} + C(M_T - \bar{x}_T)^2)}$$

где: $C = \frac{b^2 \sum S_{xx}}{b^2 \sum S_{xx} - s^2 t^2};$

$$s^2 = \frac{SS_{res}}{f_{res}};$$

t – критерий Стьюдента, см. таблицу 67 (при p = 0,05);

$$V = \frac{1}{\sum_T w}$$

Следующий раздел приведён для информации

ПРИМЕР 11

Определение ЕД₅₀ вещества, с использованием пробит метода. Количественное определение *in vitro* активности вакцины против полиомиелита, применяемой орально.

Для количественного определения ЕД₅₀ вакцины против полиомиелита было исследовано 10 различных разведений (по 8 повторений) 50 мкл исходной вакцины на ИФА-планшетах. Полученные результаты приведены в таблице 58.

Таблица 58. – Разведения (10^x мкл исходной вакцины)

- 3,5	- 4,0	- 4,5	- 5,0	- 5,5	- 6,0	- 6,5	- 7,0	- 7,5	- 8,0
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
+	+	+	+	-	+	-	-	-	-

Полученные результаты заносят в первую рабочую таблицу. В таблице 59 приведены результаты первого цикла процедуры итерации. Затем данные последних 6 столбцов суммируют для каждого из испытуемых образцов и результаты заносят во вторую рабочую таблицу, получая таблицу 60. Остальные столбцы заполняют данными, рассчитанными по формулам 6–12.

Далее значения Y первой рабочей таблицы заменяют на значения a+bx и выполняют второй цикл итерации. Циклы повторяют до тех пор, пока разница между результатами двух последовательных циклов не станет достаточно малой. В результате получают таблицу 61.

Таблица 59. – Первая рабочая таблица первого цикла

Вакцина	Доза	n	r	x	p	Y	Φ	Z	y	w	wx	wy	wx^2	wy^2	wxy	
Т	$10^{-3,5}$	8	0	- 8,06	0,000	0,00	0,5	0,399	- 1,253	5,09	- 41,04	- 6,38	330,8	8,00	51,4	
	$10^{-4,0}$	8	0	- 9,21	0,000	0,00	0,5	0,399	- 1,253	5,09	- 46,91	- 6,38	432,0	8,00	58,8	
	$10^{-4,5}$	8	1	10,36	0,125	0,00	0,5	0,399	- 0,940	5,09	- 52,77	- 4,79	546,8	4,50	49,6	
	$10^{-5,0}$	8	2	11,51	0,250	0,00	0,5	0,399	- 0,627	5,09	- 58,63	- 3,19	675,1	2,00	36,7	
	$10^{-5,5}$	8	6	12,66	0,750	0,00	0,5	0,399	0,627	5,09	- 64,50	3,19	816,8	2,00	- 40,4	
	$10^{-6,0}$	8	7	13,82	0,875	0,00	0,5	0,399	0,940	5,09	- 70,36	4,79	972,1	4,50	- 66,1	
	$10^{-6,5}$	8	7	14,97	0,875	0,00	0,5	0,399	0,940	5,09	- 76,23	4,79	1140,8	4,50	- 71,7	
	$10^{-7,0}$	8	8	16,12	1,000	0,00	0,5	0,399	1,253	5,09	- 82,09	6,38	1323,1	8,00	- 102,9	
	$10^{-7,5}$	8	8	17,27	1,000	0,00	0,5	0,399	1,253	5,09	- 87,95	6,38	1518,9	8,00	- 110,2	
	$10^{-8,0}$	8	8	18,42	1,000	0,00	0,5	0,399	1,253	5,09	- 93,82	6,38	1728,2	8,00	- 117,6	
											$\Sigma=50,93$	$\Sigma=-674,3$	$\Sigma=11,17$	$\Sigma=9484,6$	$\Sigma=57,50$	$\Sigma=-312,32$

Таблица 60. – Вторая рабочая таблица первого цикла

Вакцина	Σw	Σwx	Σwy	Σwx^2	Σwy^2	Σwxy	S_{xx}	S_{xy}	S_{yy}	\bar{x}	\bar{y}	a
Т	50,93	- 674,3	11,17	9484,6	57,50	- 312,32	556,92	- 164,43	55,05	- 13,24	0,219	- 3,690

Таблица 61. – Вторая рабочая таблица последнего цикла

Вакцина	Σw	Σwx	Σwu	Σwx^2	Σwu^2	Σwxu	S_{xx}	S_{xy}	S_{yy}	\bar{x}	\bar{y}	a
T	19,39	- 238,2	0,11	2981,1	26,05	- 37,45	55,88	- 36,11	26,05	- 12,28	0,006	- 7,931

Таблица 62. – Результаты анализа валидности

Вакцина	S_{xx}	S_{xy}	$\frac{S_{xy}^2}{S_{xx}}$	S_{yy}	$\chi_{lin}^2(S_{yy} - \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}})$
T	55,88	- 36,11	23,33	26,05	2,72

Из таблицы 70 следует, что χ_{crit}^2 (при $df = k-2h = 10-2 \cdot 1 = 8$, $p = 0,05$) = 15,507. Таким образом, $\chi_{lin}^2 < \chi_{crit}^2$, следовательно значительных отклонений от линейности не наблюдается.

Вычисление активности:

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} = \frac{-36,11}{55,88} = -0,646$$

$$M_T = \frac{-a_T}{b} = \frac{-(-7,931)}{-0,646} = -12,273$$

Вычисление доверительных границ активности:

$$s^2 = 1$$

$$t = 1,960$$

$$C = \frac{b^2 \sum S_{xx}}{b^2 \sum S_{xx} - s^2 t^2} = \frac{(-0,646)^2 \cdot 55,88}{(-0,646)^2 \cdot 55,88 - 1^2 \cdot 1,960^2} = 1,197$$

$$V = \frac{1}{\sum_T w} = \frac{1}{19,39} = 0,052;$$

$$+\Delta = CM_T - (C - 1)\bar{x}_T + \sqrt{(C - 1) \left(V \sum S_{xx} + C(M_T - \bar{x}_T)^2 \right)} =$$

$$= 1,197 \cdot (-12,273) - (1,197 - 1)(-12,28) +$$

$$+\sqrt{(1,197 - 1)(0,052 \cdot 55,88 + 1,197(-12,273 - (-12,28))^2)} = -11,518;$$

$$-\Delta = CM_T - (C - 1)\bar{x}_T - \sqrt{(C - 1) \left(V \sum S_{xx} + C(M_T - \bar{x}_T)^2 \right)} =$$

$$= 1,197 \cdot (-12,273) - (1,197 - 1)(-12,28) -$$

$$-\sqrt{(1,197 - 1) \left(0,052 \cdot 55,88 + 1,197(-12,273 - (-12,28))^2 \right)} = -13,026.$$

Для того, чтобы выразить активность в $\ln(\text{ЕД}_{50})/\text{мл}$, результаты преобразуют:

$$-(M_T) + \ln \frac{1000}{50} = -(-12,273) + 2,996 = 15,269$$

$$-(+\Delta) + \ln \frac{1000}{50} = -(-11,518) + 2,996 = 14,514$$

$$-(-\Delta) + \ln \frac{1000}{50} = -(-13,026) + 2,996 = 16,022$$

Поскольку активность такого типа вакцин обычно выражают с использованием десятичного логарифма $\lg(\text{ЕД}_{50})/\text{мл}$, полученные значения делят на $\ln(10)$:

$$\frac{15,269}{\ln(10)} = 6,63$$

$$\frac{14,514}{\ln(10)} = 6,30$$

$$\frac{16,022}{\ln(10)} = 6,96$$

В результате получают оценку активности 6,63 $\lg(\text{ЕД}_{50})/\text{мл}$. Нижняя и верхняя доверительная границы равны: 6,30 $\lg(\text{ЕД}_{50})/\text{мл}$ и 6,96 $\lg(\text{ЕД}_{50})/\text{мл}$ соответственно.

6. ОБЪЕДИНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ НЕЗАВИСИМЫХ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ОПРЕДЕЛЕНИЙ

Два количественных определения являются независимыми, если выполнение любого из них не влияет на вероятности появления возможных результатов другого. То есть случайные ошибки всех факторов, существенно влияющих на результат в ходе выполнения одного количественного определения (например, разведения стандартного образца и испытуемого образца, чувствительность биологических индикаторов) не зависят от соответствующих случайных ошибок этих факторов в ходе выполнения другого количественного определения. Так, например, количественные определения, которые проводят в последующие дни с использованием одинаковых сохранённых разведений стандартного образца, не являются независимыми.

Если данные количественного определения основываются на использовании модели параллельных линий или модели пробит-анализа, полученные значения активностей перед объединением необходимо представить в логарифмическом виде. Значения активностей, полученные при использовании модели угловых коэффициентов, объединяют без преобразований. Поскольку модель параллельных линий используют чаще, в данном разделе в формулах используется символ M , обозначающий натуральный логарифм отношения активностей. Подставляя вместо M отношения угловых коэффициентов R , можно применять те же формулы для определения активностей, найденных при использовании модели угловых коэффициентов. Перед объединением значения активностей всех исследованных образцов должны быть скорректированы по отношению к установленной активности.

Ниже описаны три простых метода аппроксимации, однако могут использоваться и другие методы, если выполнены необходимые условия объединения результатов.

6.1. ВЗВЕШЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Данный метод может быть использован, если выполняются следующие условия:

- 1) оценки активностей получены в ходе независимых количественных определений;
- 2) для каждого из количественных определений значение C близко к 1 (например, $0,9 < C < 1,1$);
- 3) число степеней свободы конкретных остаточных дисперсий не меньше 6 и предпочтительно больше 15;

Если эти условия не выполняются, метод взвешенного объединения результатов нельзя использовать. В этом случае для нахождения наилучшей оценки средней активности, которая затем будет применяться в последующих количественных определениях в качестве предполагаемой активности, может быть использован метод, описанный в подразделе 7.2. *Невзвешенное объединение результатов количественного определения.*

6.1.1. Однородность оценок активности

Предположим, что проведено n' количественных определений, в ходе которых получено n' значений M с соответствующими доверительными интервалами. Для каждого количественного определения рассчитывают логарифмический доверительный интервал L путём вычитания натурального логарифма нижнего значения из натурального логарифма верхнего. Вес W для каждого значения M вычисляют по формуле:

$$W = \frac{4t^2}{L^2}$$

Критерий Стьюдента t в представленной выше формуле имеет то же значение, которое используют при расчёте доверительных интервалов. Получают статистический ряд, приблизительно распределённый как χ^2 (Таблица 70), который может использоваться для оценки однородности множества натуральных логарифмов оценок активностей:

$$\chi^2 \approx \sum_{n'} W(M - \bar{M})^2$$

$$\bar{M} = \frac{\sum WM}{\sum W}$$

Если рассчитанное значение χ^2 меньше табличного значения, соответствующего $(n'-1)$ степеней свободы, то активности однородны, и использование метода, описанного в пункте 7.1.2. *Взвешенное объединение на основе дисперсии внутри испытаний*, обосновано.

Если рассчитанное значение статистического ряда больше табличного, активности неоднородны. В этом случае формулы, описанные в пункте 7.1.2. *Взвешенное объединение на основе дисперсии внутри испытаний*, неприменимы. Вместо них могут быть использованы формулы, приведённые в пункте 7.1.3. *Полувзвешенное объединение на основе дисперсий внутри испытаний и между ними*.

6.1.2. Взвешенное объединение на основе дисперсии внутри испытаний

Получают значение логарифма взвешенной средней активности:

$$\bar{M} = \frac{\sum WM}{\sum W}$$

Затем считают стандартную ошибку натурального логарифма средней активности:

$$s_{\bar{M}} = \sqrt{\frac{1}{\sum W}}$$

Приблизительные границы доверительного интервала равны антилогарифмам значений, которые получают по формуле:

$$\bar{M} \pm t \cdot s_{\bar{M}}$$

где число степеней свободы t равно сумме чисел степеней свободы средних квадратов ошибок отдельных количественных испытаний.

6.1.3. Полувзвешенное объединение на основе дисперсий внутри испытаний и между ними

При объединении результатов нескольких повторных количественных определений величина χ^2 может быть статистически значимой. В этом случае полученная дисперсия состоит из двух частей:

– дисперсия между испытаниями (изменяется от одного количественного определения до другого)

$$s_M^2 = 1/W;$$

– дисперсия внутри испытаний (является общей для всех M)

$$s_m^2 = \frac{\sum(M-\bar{M})^2}{n'-1} - \frac{\sum s_M^2}{n'}$$

где: M – невзвешенное среднее значение.

Для каждого значения M рассчитывают весовой коэффициент, который заменяет значение W из пункта 7.1.2. *Взвешенное объединение на основе дисперсии внутри испытаний*; при этом t приблизительно равно 2.

$$W' = \frac{1}{s_M^2 + s_m^2}$$

Если $s_m^2 < 0$, то s_m^2 заменяют на 0.

6.2. НЕВЗВЕШЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Метод может быть использован, если не выполняются условия, изложенные в подразделе 7.1. *Взвешенное объединение результатов количественного определения*. Для объединения n' оценок для значений M при n' количественных определениях вычисляют среднее значение активности. Считают оценку стандартного отклонения по формуле:

$$s_{\bar{M}}^2 = \frac{\sum(M - \bar{M})^2}{n'(n' - 1)}$$

Вычисляют границы доверительного интервала:

$$\bar{M} \pm t \cdot s_{\bar{M}}$$

Следующий раздел приведён для информации

ПРИМЕР 12

Взвешенное объединение шести результатов количественного определения активности.

Таблица 63. – Взвешенное среднее результатов независимых испытаний

Оценка активности, МЕ/фл	Нижняя граница доверительного интервала, МЕ/фл	Верхняя граница доверительного интервала, МЕ/фл	L	Число степеней свободы (f)	M	Вес(W) $W = \frac{4t^2}{L^2}$ t= 2.086 (при df=20 и p=0,05)	WM	$W(M - \bar{M})^2$
18367	17755	19002	0,0679	20	9,8183	3777,6976	37090,6099	0,3716
18003	17415	18610	0,0664	20	9,7983	3951,5439	38718,3884	0,4030
18054	17319	18838	0,0679	20	9,8011	2462,4715	24134,9854	0,1301
17832	17253	18429	0,0659	20	9,7887	4002,9713	39184,0851	1,5444
18635	17959	19339	0,0740	20	9,8328	3175,6286	31225,3115	1,8913
18269	17722	18834	0,0609	20	9,8130	4699,5160	46116,1668	0,0980
				$\Sigma=120$		$\Sigma=22069,8292$	$\Sigma=216469,5473$	$\Sigma=4,4386$

Оценка однородности оценок активности.

Получают значение логарифма взвешенной средней активности:

$$\bar{M} = \frac{\sum WM}{\sum W} = \frac{216469,5473}{22069,8292} = 9,8083$$

Получают статистический ряд ($\chi^2_{\text{набл.}}$):

$$\chi_{\text{набл.}}^2 = \sum_{n_i'} W(M - \bar{M})^2 = 4,4386$$

Получают $\chi_{\text{табл.}}^2$:

$$\chi_{\text{табл.}}^2 \text{ (при } df = n' - 1 = 5, p = 0,05) = 11,070$$

Так как $\chi_{\text{набл.}}^2 < \chi_{\text{табл.}}^2$, то активности однородны, и использование метода, описанного в пункте 7.1.2. *Взвешенное объединение на основе дисперсии внутри испытаний*, обосновано.

Считают стандартную ошибку натурального логарифма средней активности:

$$s_{\bar{M}} = \sqrt{\frac{1}{\sum W}} = \sqrt{\frac{1}{22069,8292}} = 0,0067$$

Рассчитывают приблизительные границы доверительного интервала:

$$t = 1,9799 \text{ (при } df = 120 \text{ и } p = 0,05)$$

$$\ln(-\Delta) = \bar{M} - t \cdot s_{\bar{M}} = 9,8083 - 1,9799 \cdot 0,0067 = 9,7950$$

$$\ln(+\Delta) = \bar{M} + t \cdot s_{\bar{M}} = 9,8083 + 1,9799 \cdot 0,0067 = 9,8217$$

Оценка активности:

$$e^{9,8083} = 18185,7301 \text{ ME/фл}$$

Оценка нижней границы доверительного интервала:

$$-\Delta = e^{9,7950} = 17944,9668 \text{ ME/фл}$$

Оценка верхней границы доверительного интервала:

$$+\Delta = e^{9,8217} = 18429,7237 \text{ ME/фл}$$

Следующий раздел приведён для информации

ПРИМЕР 13

Невзвешенное объединение шести результатов количественного определения активности.

Таблица 64. – *Невзвешенное среднее результатов независимых испытаний*

Оценка активности, МЕ/фл	Нижняя граница доверительного интервала, МЕ/фл	Верхняя граница доверительного интервала, МЕ/фл	L	Число степеней свободы (f)	M	$(M - \bar{M})^2$
18367	17755	19002	0,0679	20	9,8183	$9,2257 \cdot 10^{-5}$
18003	17415	18610	0,0664	20	9,7983	$1,0841 \cdot 10^{-4}$
18054	17319	18838	0,0679	20	9,8011	$5,7505 \cdot 10^{-5}$
17832	17253	18429	0,0659	20	9,7887	$3,9823 \cdot 10^{-4}$
18635	17959	19339	0,0740	20	9,8328	$5,8037 \cdot 10^{-4}$
18269	17722	18834	0,0609	20	9,8130	$1,8106 \cdot 10^{-5}$
				$\Sigma=120$	$\Sigma=58,8522$	$\Sigma=4,4386$

Получают значение логарифма средней активности:

$$\bar{M} = \frac{\sum M}{n'} = \frac{58,8522}{6} = 9,8087$$

Считают оценку стандартного отклонения по формуле:

$$s_{\bar{M}}^2 = \frac{\sum(M - \bar{M})^2}{n'(n' - 1)}$$

$$s_{\bar{M}} = \sqrt{\frac{\sum(M - \bar{M})^2}{n'(n' - 1)}} = \sqrt{\frac{1,2368 \cdot 10^{-3}}{6(6 - 1)}} = 0,0064$$

Рассчитывают приблизительные границы доверительного интервала:

$$t = 2,571 \text{ (при } df = 5 \text{ и } p = 0,05)$$

$$\ln(-\Delta) = \bar{M} - t \cdot s_{\bar{M}} = 9,8087 - 2,571 \cdot 0,0064 = 9,7920$$

$$\ln(+\Delta) = \bar{M} + t \cdot s_{\bar{M}} = 9,8087 + 2,571 \cdot 0,0064 = 9,8253$$

Оценка активности:

$$e^{9,8087} = 18191,4282 \text{ ME/фл}$$

Оценка нижней границы доверительного интервала:

$$-\Delta = e^{9,7920} = 17891,4868 \text{ ME/фл}$$

Оценка верхней границы доверительного интервала:

$$+\Delta = e^{9,8253} = 18496,3979 \text{ ME/фл}$$

7. ОБЩИЕ ЛИНЕЙНЫЕ МОДЕЛИ

Принцип основан на построении линейной матрицы структуры X (или матрицы плана), в которой каждая строка представляет результаты наблюдения, а каждый столбец – один из линейных факторов (образец, блок, столбец, доза). Например, в случае дизайна латинского квадрата, рассмотренной в примере 7, такая матрица состояла бы из 36 строк и 13 столбцов – по одному столбцу на каждый из образцов, один столбец для доз, пять столбцов на каждый из блоков, за исключением первого, и пять столбцов для каждой строки, за исключением первой. Все столбцы, за исключением одного для доз, заполняют 0 или 1 в зависимости от того, связано данное наблюдение с данным фактором или нет. Вектор Y заполняют результатами наблюдений (преобразованными). Искомые параметры вычисляют по формуле $(X^T X)^{-1} X^T Y$, после чего оценка активности m может быть легко получена как отношение соответствующих параметров. Доверительные интервалы рассчитывают на основе теоремы Филлера:

$$m_L, m_U = \frac{\left[m - \frac{g v_{12}}{v_{22}} \pm \frac{ts}{b} \sqrt{v_{11} - 2m v_{12} + m^2 v_{22} - g \left(v_{11} - \frac{v_{12}^2}{v_{22}} \right)} \right]}{1 - g}$$

где: $g = \frac{t^2 s^2 v_{22}}{b^2};$

v_{11} – множитель дисперсии знаменателя;

v_{22} – множитель дисперсии числителя;

v_{12} – множитель ковариации.

Множители можно непосредственно вычислить из матрицы $(X^T X)^{-1}$ или косвенным методом, приняв во внимание, что:

$$Var(a_1 - a_2) = Var(a_1) + Var(a_2) - 2Cov(a_1, a_2)$$

$$Cov(a_1 - a_2, b) = Cov(a_1, b) - Cov(a_2, b)$$

В случае количественных определений, основанных на качественных ответах, факторы линейности находят путём максимизации суммы по группам воздействий образцов:

$$n \ln(\Phi(a_i + bx)) + (n - r) \ln(1 - \Phi(a_i + bx)),$$

где x – натуральный логарифм дозы, Φ – определяет форму распределения, $i \in \{S, T, \dots\}$.

8. РЕЗКО ВЫДЕЛЯЮЩИЕСЯ ЗНАЧЕНИЯ (ВЫБРОСЫ)

Недостатком метода наименьших квадратов, описанного в данном разделе, является его высокая чувствительность к резко отклоняющимся от среднего значения данным. Выброс может целиком исказить результаты вычислений. Эту проблему часто решают путём исключения подозрительных значений на основании их относительной величины. Такой подход может привести к субъективному исключению данных – не всегда корректному и безопасному. Отклонение наблюдений только на основании их относительной величины, без выяснения причины, является нежелательной процедурой. Тест на выброс является лишь статистическим анализом данных, полученных в результате испытания. Он не позволяет выявить причину экстремального наблюдения и, следовательно, не должен быть единственным основанием для исключения подозрительного ответа.

Если у подозрительного ответа есть чёткая, идентифицируемая причина, обусловленная ошибкой человека или неисправностью прибора, то такое значение на основании одного из критериев признают выбросом и исключают из расчётов. Если у подозрительного ответа нет идентифицируемой причины, то есть оно получено закономерно, то такое значение следует оставить.

Подозрительный ответ может быть проверен по одному из двух критериев, описанных ниже. Каждый из критериев предполагает, что данные имеют приблизительно нормальное распределение. Можно использовать и другие статистически обоснованные подходы к обнаружению выбросов.

8.1. КРИТЕРИЙ ДИКСОНА

Критерий основан на дисперсии в пределах одной группы предположительно эквивалентных ответов, например, группы животных, которым дали одну и ту же концентрацию одного и того же образца. Ответы располагают в порядке возрастания от y_1 до y_N , где N – количество наблюдений в группе. Вычисляют критерий Диксона, используя формулы, приведенные в таблице 65.

Таблица 65. – Формулы для нахождения критерия Диксона

Количество наблюдений в группе (N)	Кандидат на выброс – минимальное значение	Кандидат на выброс – максимальное значение
3-7	$G_1 = \frac{y_2 - y_1}{y_N - y_1}$	$G_1 = \frac{y_N - y_{N-1}}{y_N - y_1}$
8-10	$G_1 = \frac{y_2 - y_1}{y_{N-1} - y_1}$	$G_1 = \frac{y_N - y_{N-1}}{y_N - y_2}$

11-13	$G_1 = \frac{y_3 - y_1}{y_{N-1} - y_1}$	$G_1 = \frac{y_N - y_{N-2}}{y_N - y_2}$
-------	-----------------------------------------	-----------------------------------------

Если G_1 , G_2 или G_3 , в зависимости от случая, превышает критическое значение, указанное в таблице 71, для наблюдаемого N , существует статистическая основа для идентификации подозрительного ответа как выброса и рассмотрения возможности его удаления. Для $N > 13$ можно использовать критерий Граббса.

8.2. КРИТЕРИЙ ГРАББСА

Для значения R , наиболее удалённого от среднего по выборке, рассчитывают стандартизированное отклонение Z :

$$Z = \frac{R - \bar{R}}{S}$$

где: R – среднее отклонение набора значений;
 S – стандартное отклонение набора значений.

Если $|Z|$ больше C , формула расчёта которого представлена ниже, то значение R идентифицируется как статистический выброс.

$$C = \frac{(N - 1)t_{df-1,p}}{\sqrt{N(N - 2 + t_{df-1,p}^2)}}$$

$$p = 1 - \frac{\alpha}{2N}$$

Довольно сложно дать общие рекомендации, касающиеся решения относительно того, является ли конкретный результат наблюдения выбросом или нет, и с этим связано появление и развитие ряда робастных методов анализа. Эти методы менее чувствительны к выбросам за счёт того, что результатам, которые в большей мере отличаются от прогнозируемого значения, придаётся меньший вес. В данном случае возникает ряд новых проблем, связанных с расчётом доверительных интервалов, а также с определением подходящей функции для минимизации ошибок.

Следующий раздел приведён для информации

ПРИМЕР 14

В случае если в примере 4 ответ на дозу u_2 в первом блоке равен 5, такое значение является подозрительным и следует провести тест на выброс. Так как количество наблюдений в группе петушков, которым вводили дозу u_2 , равно 4 ($N < 13$), можно использовать критерий Диксона (для $11 \leq N \leq 13$). Ответы располагают в порядке возрастания и получают:

y_1	y_2	y_3	y_4
5	22	23	24

Так как количество наблюдений в группе (N) входит в интервал 3–7, а кандидат на выброс – минимальное значение ($y_1 = 5$), то в соответствии с таблицей 65 для нахождения критерия Диксона используют следующую формулу:

$$G_1 = \frac{y_2 - y_1}{y_N - y_1} = \frac{22 - 5}{24 - 5} = \frac{17}{19} = 0,895$$

Так как G_1 превышает критическое значение, указанное в таблице 71 для $N = 4$, то существует статистическая основа для идентификации подозрительного ответа как выброса и рассмотрения возможности его удаления. В случае принятия решения об исключении ответа $y_1 = 5$, необходимо заменить пропущенное значение величиной y' , рассчитанной по формуле 1:

$$y' = \frac{nB' + kT' - G'}{(n-1)(k-1)}$$

$$B' = 12 + 20 + 14 = 46$$

$$T' = 22 + 23 + 24 = 69$$

$$G' = 267$$

$$y' = \frac{4 \cdot 46 + 2 \cdot 2 \cdot 69 - 267}{(4-1)(2 \cdot 2 - 1)} = 21,44$$

Таким образом, значение 21,44 ставят на место пропуска. Дальнейшие вычисления проводят также как в примере 4, но число степеней свободы для общей и для остаточной дисперсий заменяют на 14 и 8 соответственно, т. е. уменьшают на 1.

9. ПРИЛОЖЕНИЯ

В данном разделе приведены таблицы с критическими значениями для наиболее часто встречающихся степеней свободы. Многие компьютерные программы включают статистические функции, и их использование рекомендовано вместо данных таблиц.

Таблица 66. – Критические значения критерия Фишера при $p = 0,05$

f_2 – число степеней свободы для меньшей дисперсии (знаменателя)	f_1 – число степеней свободы для большей дисперсии (числителя)											
	1	2	3	4	5	6	8	10	12	15	20	∞
10	4,965	4,103	3,708	3,478	3,326	3,217	3,072	2,978	2,913	2,845	2,774	2,538

12	4,747	3,885	3,490	3,259	3,106	2,996	2,849	2,753	2,687	2,617	2,544	2,296
15	4,543	3,682	3,287	3,056	2,901	2,790	2,641	2,544	2,475	2,403	2,328	2,066
20	4,351	3,493	3,098	2,866	2,711	2,599	2,447	2,348	2,278	2,203	2,124	1,843
25	4,242	3,385	2,991	2,759	2,603	2,490	2,337	2,236	2,165	2,089	2,007	1,711
30	4,171	3,316	2,922	2,690	2,534	2,421	2,266	2,165	2,092	2,015	1,932	1,622
50	4,034	3,183	2,790	2,557	2,400	2,286	2,130	2,026	1,952	1,871	1,784	1,438
∞	3,841	2,996	2,605	2,372	2,214	2,099	1,938	1,831	1,752	1,666	1,571	1,000

Таблица 67. – Критические значения критерия Стьюдента при $p = 0,05$

df	t	df	t
1	12,706	22	2,074
2	4,303	24	2,064
3	3,182	26	2,056
4	2,776	28	2,048
5	2,571	30	2,042
6	2,447	35	2,030
7	2,365	40	2,021
8	2,306	45	2,014
9	2,262	50	2,009
10	2,228	60	2,000
12	2,179	70	1,994
14	2,145	80	1,990
16	2,120	90	1,987
18	2,101	100	1,984
20	2,086	∞	1,960

Таблица 68. – Значения константы \acute{c} для вычисления доверительных границ активности

Количество доз	Число испытуемых образцов	\acute{c}
2	1	1
	2	3/2
	3	2
	4	5/2
	5	3
3	1	8/3
	2	4
	3	16/3
	4	20/3
	5	8

Таблица 69. – Значения функции кумулятивного стандартного нормального распределения

x	Φ	x	Φ	x	Φ
0,00	0,500	1,00	0,841	2,00	0,977
0,05	0,520	1,05	0,853	2,05	0,980
0,10	0,540	1,10	0,864	2,10	0,982

0,15	0,560	1,15	0,875	2,15	0,984
0,20	0,579	1,20	0,885	2,20	0,986
0,25	0,599	1,25	0,894	2,25	0,988
0,30	0,618	1,30	0,903	2,30	0,989
0,35	0,637	1,35	0,911	2,35	0,991
0,40	0,655	1,40	0,919	2,40	0,992
0,45	0,674	1,45	0,926	2,45	0,993
0,50	0,691	1,50	0,933	2,50	0,994
0,55	0,709	1,55	0,939	2,55	0,995
0,60	0,726	1,60	0,945	2,60	0,995
0,65	0,742	1,65	0,951	2,65	0,996
0,70	0,758	1,70	0,955	2,70	0,997
0,75	0,773	1,75	0,960	2,75	0,997
0,80	0,788	1,80	0,964	2,80	0,997
0,85	0,802	1,85	0,968	2,85	0,998
0,90	0,816	1,90	0,971	2,90	0,998
0,95	0,829	1,95	0,974	2,95	0,998

Значения Φ для отрицательных x находят из таблицы 69 по формуле $1 - \Phi(-x)$.

Таблица 70. – Критические значения критерия хи-квадрат (χ^2) при $p=0,05$

df	χ^2	df	χ^2
1	3,841	11	19,675
2	5,991	12	21,026
3	7,815	13	22,362
4	9,488	14	23,685
5	11,070	15	24,996
6	12,592	16	26,296
7	14,067	20	31,410
8	15,507	25	37,652
9	16,919	30	43,773
10	18,307	40	55,758

Таблица 71. – Критические значения критерия Диксона

Количество наблюдений в группе (N)	Значения критерия Диксона при $p = 0,01$
3	0,988
4	0,889
5	0,780
6	0,698
7	0,637

8	0,683
9	0,635
10	0,597
11	0,679
12	0,642
13	0,615