

УДК 531/534: [57+61]

СТОХАСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОВТОРЯЕМОСТИ ПРОЦЕССА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕСТРУКЦИИ ДРОТАВЕРИНА ГИДРОХЛОРИДА

А.А. Селянинов¹, Е.В. Вихарева², И.Б. Ившина³, А.А. Баранова¹, Ю.Н. Карпенко²

¹ Кафедра теоретической механики Пермского национального исследовательского политехнического университета, Россия, 614990, Пермь, Комсомольский проспект, 29, e-mail: luba@theormech.pstu.ac.ru

² Кафедра токсикологической химии Пермской государственной фармацевтической академии, Россия, 614990, Пермь, ул. Полевая, 2, e-mail: perm@pfa.ru

³ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, Россия, 614081, Пермь, ул. Голева, 13, e-mail: ivshina@iegm.ru

Аннотация. Процесс биологической деструкции имеет биомеханический характер, так как подвод питательных субстратов колониям иммобилизованных актинобактерий осуществляется механическим путем при интенсивном перемешивании культуральной жидкости в орбитальном шейкере. В силу множества факторов, влияющих на результат течения, и в силу невозможности количественного описания взаимосвязи факторов – результата течения как функций времени процесс биологической деструкции можно назвать нестационарным случайным. В результате имеется реальная проблема стохастического анализа повторяемости процессов биологической деструкции в лабораторных, межлабораторных и тем более в промышленных условиях. Рассмотренные (*in vitro*) результаты экспериментов на повторяемость процесса биологической деструкции дротаверина гидрохлорида с применением актинобактерий в качестве нестационарного случайного процесса входят в класс кинетически моделируемых биомеханических случайных процессов. Особенностью класса является определенная монотонность при возрастании или убыли определяющего процесс параметра и наличие современных методов его регистрации, что позволяет произвести кинетическое моделирование реализаций случайного процесса. В результате нестационарный случайный процесс сводится к неслучайной функции системы двух случайных величин. Реализации случайного процесса биологической деструкции дротаверина гидрохлорида с применением актинобактерий моделируются кинетическими уравнениями первого порядка с линейно изменяющейся константой реакции. Для экспериментов на повторяемость процесса биологической деструкции получены аналитические зависимости математического ожидания, дисперсии и среднего квадратичного отклонения от времени, а также при гипотезе нормального закона распределения системы случайных величин в каждом сечении процесса определены области реализаций при повторении, в которых с определенной вероятностью можно прогнозировать течение процесса во времени.

Ключевые слова: дротаверина гидрохлорид, повторяемость биодеструкции, кинетическое моделирование, нестационарный биомеханический случайный процесс, функция системы двух случайных величин, стохастический анализ, области реализаций.

© Селянинов А.А., Вихарева Е.В., Ившина И.Б., Баранова А.А., Карпенко Ю.Н., 2013

Селянинов Александр Анатольевич, д.т.н., профессор кафедры теоретической механики, Пермь
Вихарева Елена Владимировна, д.фарм.н., заведующая кафедрой токсикологической химии, Пермь
Ившина Ирина Борисовна, д.биол.н., заведующая лабораторией алканотрофных микроорганизмов, Пермь
Баранова Анна Александровна, магистрант кафедры теоретической механики, Пермь
Карпенко Юлия Николаевна, к.фарм.н., доцент кафедры токсикологической химии, Пермь

ВВЕДЕНИЕ

Для утилизации негодных к употреблению лекарственных средств перспективным является метод биологической деструкции с применением актинобактерий. При оптимизации параметров различных процессов биологической деструкции в работе [7] проведен сравнительный анализ и показана идентичность результатов по функции желательности и методу минимизации целевой функции, предложенной авторами.

В работах [2, 3, 5] рассмотрены процессы биологической деструкции парацетамола, парааминофенола и дротаверина гидрохлорида в лабораторных условиях на основе кинетического моделирования, что позволило получить новые возможности анализа.

Следует отметить, что процесс биологической деструкции имеет заметную биомеханическую составляющую, так как подвод питательных субстратов колониям иммобилизованных актинобактерий осуществляется механическим путем при интенсивном перемешивании культуральной жидкости в орбитальном шейкере. В работе [4] с применением кинетического моделирования определены оптимальные параметры (орбитальной скорости вращения платформы шейкера и температуры культуральной жидкости) при биологической деструкции парацетамола.

Колонии актинобактерий с субстратами утилизируемых лекарственных средств представляют собой биологическую систему, в которой наблюдается множество различных процессов, развивающихся во времени. Применяемый для анализа статистический подход производится по схеме: исходное состояние – вариант параметров биологической деструкции – результат утилизации, т.е. на уровне случайных величин, на основе чего производится корреляционный анализ их взаимосвязей.

При этом внутреннее содержание процесса биологической деструкции в результате разброса конкретных реализаций во времени, казалось бы, при одинаковых условиях не анализируется в качестве случайного процесса. В действительности процесс биологической деструкции в силу множества факторов, влияющих на результат течения, и в силу невозможности количественного описания взаимосвязи факторов – результата течения как функций времени является нестационарным случайным. В результате имеется реальная проблема стохастического анализа повторяемости процессов биологической деструкции в лабораторных, межлабораторных и тем более в промышленных условиях.

В экспериментальной медицинской и биологической практике произвести стохастический анализ случайного процесса несколько проще, чем в практической медицине, так как зачастую имеется возможность постоянного мониторинга определяющего процесс параметра с применением современного оборудования, т.е. можно проследить за каждой реализацией случайного процесса.

Однако исследование случайного процесса, особенно нестационарного, в полном объеме с определением математического ожидания и корреляционной функции путем статистической обработки результатов экспериментов чрезвычайно дорого и растянуто во времени, поэтому целесообразно только в особых эксклюзивных случаях. Известен достаточно общий метод анализа нестационарных случайных процессов путем канонического разложения Пугачева [11]. Метод фактически позволяет свести нестационарный случайный процесс к функции системы бесконечного числа независимых случайных величин с сопутствующим определением корреляционной функции от времени. Метод осуществим при достаточно большом количестве реализаций случайного процесса с сопутствующим анализом сходимости.

В реальности количество реализаций случайного процесса ограничено. Практикующих специалистов в стохастическом анализе случайного процесса интересуют математическое ожидание, определенное на текущий момент времени значение дисперсии и область, в которой с определенной вероятностью можно прогнозировать течение конкретной реализации процесса.

С целью решения этой проблемы в работе А.А. Селянинова [10] определен класс кинетически моделируемых биомеханических случайных процессов, т.е. тех, что отвечают некоторым условиям при наличии ограниченного числа реализаций и ограниченного количества экспериментальных точек в каждой реализации.

В результате можно сформулировать цели предлагаемой работы:

1. Рассмотреть биомеханические основы процесса биологической деструкции и показать необходимость его кинетического моделирования.

2. Рассмотреть эксперименты (*in vitro*) на повторяемость процесса биологической деструкции дротаверина гидрохлорида с помощью актинобактерий в качестве нестационарного случайного процесса.

3. Представить нестационарный случайный процесс биологической деструкции в качестве неслучайной функции системы двух случайных величин с применением кинетического моделирования реализаций.

4. Определить для серии экспериментов на повторяемость биологической деструкции аналитические зависимости числовых характеристик нестационарного случайного процесса от времени, а также области реализаций с определенной вероятностью при повторении процесса с использованием гипотезы нормального распределения для системы двух случайных величин, которые являются случайными параметрами процесса.

БИОМЕХАНИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОЦЕССА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕКТРУКЦИИ

Биологическая деструкция заключается в разложении водного раствора или суспензии лекарственных средств бактериями, которые присутствуют в природных средах, например, в почве. В естественных условиях дождевая и талая влага в процессе фильтрации через почву растворяет лекарственные средства и доносит их до бактерий в качестве источника питания. Использование искусственно выделенных активных штаммов бактерий, их иммобилизация на носителе, образование колоний и адаптация ферментного комплекса бактерий к определенному лекарственному средству или его структурному аналогу интенсифицируют биологическую деструкцию по сравнению с естественной в природе. Следует отметить, что в естественных условиях биологическая деструкция веществ может происходить не полностью, и в этом случае токсичные ксенобиотики, такие как, в частности, производные фенола, могут поступать в источники водоснабжения.

В лабораторных условиях, как и в естественных, процесс биологической деструкции также основан на механической подаче питательной среды (растворенного в воде лекарственного вещества) колониям бактерий, адсорбированным на носителях типа древесных опилок. Интенсивность перемешивания в лабораторном шейкере определяет скорость проникновения питательной для бактерий среды внутрь рыхлой структуры колоний бактерий.

В работе [1] показан механизм проникновения раствора внутрь колонии бактерий даже при ламинарном движении жидкости в колбе, установленной в лабораторном шейкере. Он основан на разнице скоростей движения жидкости, окружающей колонию, что приводит к ее вращению, в результате чего конгломераты бактерий насыщаются питательной средой. Экспериментально отмечена и в работе [9] аналитически получена зависимость формы свободной поверхности жидкости в колбе от скорости вращения шейкера, которая отражает неравномерность поля скоростей.

Сбои при экспериментах типа остановки шейкера резко снижают эффективность биологической деструкции из-за прекращения подачи питательной среды колониям бактерий за счет механического перемешивания, что свидетельствует о недостаточности перемешивания жидкости в данном случае только за счет свободной конвекции.

Экспериментальные исследования показали, что основным механическим параметром, определяющим скорость биологической деструкции, является угловая скорость лабораторного шейкера. Вторым по значимости параметром является температура раствора.

Температурные задачи традиционно относятся к задачам механики, так как температура влияет на механические свойства материалов, в данном случае – на скорость процесса биодеструкции.

В работе [4] установлены экспериментальные зависимости константы процесса биологической деструкции парацетамола от угловой скорости вращения шейкера и температуры раствора, что позволило получить с применением геометрической интерпретации их рациональные значения. В этой же работе введен критерий интенсивности перемешивания, который позволяет перейти от результатов, полученных в лабораторном шейкере, к параметрам полупромышленного биологического реактора и технологии промышленной утилизации непригодных к использованию лекарственных средств.

В промышленных условиях при большом объеме раствора утилизируемого лекарственного средства интенсивность перемешивания в различных областях реактора значительно отличается от средней по объему. Процесс биологической деструкции при этом происходит неравномерно. Для определения изменения во времени средней концентрации лекарственного вещества следует знать распределение по объему интенсивности перемешивания, которая определяется неравномерностью поля скоростей.

В результате необходима постановка и реализация краевой задачи о течении культуральной жидкости в реакторе, связанной с кинетическим уравнением биологической деструкции. Краевая задача определяет поле скоростей, неравномерность поля определяет интенсивность перемешивания в каждой точке объема, интенсивность же – величины параметров кинетического уравнения биологической деструкции, а кинетическое уравнение в свою очередь – изменение концентрации утилизируемого лекарственного средства. Связанность данной постановки односторонняя, так как поле скоростей влияет на изменение концентрации, а концентрация на поле скоростей не влияет в силу незначительного изменения вязкости культуральной жидкости.

Таким образом, вышесказанное свидетельствует о необходимости кинетического моделирования процесса биологической деструкции лекарственных средств в ходе лабораторных исследований и при разработке промышленных технологий. Помимо этого, учитывая разброс данных при повторении экспериментов по биологической деструкции при, казалось бы, одинаковых исходных условиях, кинетические уравнения полезны при прогнозировании с заданной вероятностью результата биологической деструкции лекарственных средств.

КИНЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕАЛИЗАЦИЙ ПРОЦЕССА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕКТРУКЦИИ

Кинетическое моделирование на основе экспериментальных данных используется для существенного улучшения анализа нестационарного случайного процесса.

Эксперименты по биологической деструкции дротаверина гидрохлорида осуществлялись с применением клеток *R. Rhodochrous* ИЭГМ 647 [8]. Процесс производился после адаптации клеток на мясном бульоне при 0,005%-ной концентрации дротаверина гидрохлорида в условиях дробного внесения.

Определяющими процесс параметрами являются концентрация $x(t)$, мг/мл, и скорость $v(t)$, мг/(мл · сут), изменения концентрации дротаверина гидрохлорида в культуральной жидкости как функции времени.

При экспериментах для каждой пробы культуральной жидкости выполнялось 3–5 измерений концентрации субстрата и представлялось усредненное значение. При этом имеет место аспект случайности при анализе биологической деструкции, который связан с погрешностью измерений современными методами начальной концентрации субстрата x_0 и ее текущего значения x .

Однако относительная погрешность современного метода определения концентраций реагентов с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии находится в пределах 2%, что в данном случае ничтожно мало в сравнении с разбросом данных

по повторяемости реализаций, поэтому при анализе случайного поведения концентрации субстрата остается только аспект о чисто биологической и биомеханической сущности процесса.

В результате при экспериментальном изучении повторяемости биологической деструкции дротаверина гидрохлорида как случайного процесса, исходя из требований фармакопеи [6], получены три серии значений текущей концентрации субстрата x через определенные промежутки времени (табл. 1).

По данным табл. 1 не наблюдается осцилляций концентрации при изменении времени, т.е. зависимости достаточно гладкие. Изменения концентрации дротаверина гидрохлорида от времени в каждой реализации случайного процесса являются невозрастающими функциями с выпуклостью вниз, поэтому для кинетического моделирования применимы уравнения первого порядка.

В известных работах по кинетическому моделированию процессов биологической деструкции лекарственных средств успешно использовались кинетические уравнения первого порядка с линейной зависимостью от времени константы реакции, адекватно отражающие динамику изменения начальных концентраций исходных субстратов [1, 3, 12].

В результате анализируемый нестационарный случайный процесс принадлежит классу кинетически моделируемых биомеханических случайных процессов и может исследоваться с применением кинетических уравнений первого порядка. Идея о принадлежности процесса биологической деструкции дротаверина гидрохлорида данному классу обоснована в работе [10], но для тридцатидневного процесса реализуется впервые.

Кинетическое уравнение первого порядка описывает изменение скорости процесса

$$v(t) = \frac{dx}{dt} = -k(t) \cdot x, \quad (1)$$

где константа реакции $k(t) = b + a t$ – линейная функция времени биодegradации.

Здесь параметр b , 1/сут, влияет на скорость процесса биологической деструкции, а параметр a , 1/сут², отражает влияние на скорость ускорения или замедления процесса во времени. При этом скорость процесса биологической деструкции $v(t)$ равна правой части в уравнении (1) и зависит от концентрации $x(t)$ утилизируемого субстрата.

Результат интегрирования кинетического уравнения (1) при известной начальной концентрации x_0 субстрата имеет вид

$$x = x_0 \cdot \exp(-(b + a t / 2)t). \quad (2)$$

Значения параметров a и b для уравнений (1, 2) в трех реализациях, рассчитанные по данным из табл. 1 с помощью метода наименьших квадратов, приведены в табл. 2.

На рис. 1 представлены результаты кинетического моделирования реализаций исследуемого нестационарного процесса биологической деструкции: а) зависимости концентрации субстрата; б) скорости изменения концентрации во времени.

Таблица 1

Динамика содержания дротаверина гидрохлорида в процессе биологической деструкции клетками *R. Rhodochrous* ИЭГМ 647

| Концентрация дротаверина гидрохлорида | t , сут | | | | |
|---------------------------------------|-----------|----------|----------|----------|---------|
| | 0 | 2 | 5 | 20 | 30 |
| x , мг/мл | 0,002 | 0,000810 | 0,000558 | 0,000182 | 0,00002 |
| | 0,002 | 0,000146 | 0,000075 | 0,000056 | 0,00002 |
| | 0,002 | – | 0,000204 | – | 0,00002 |

Таблица 2

Ускорение a и скорость b константы реакции в реализациях случайного процесса

| Номер реализации, n | a , сут ⁻² | b , сут ⁻¹ |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1 | -0,01854 | 0,3773 |
| 2 | -0,07220 | 1,0888 |
| 3 | -0,02440 | 0,5195 |

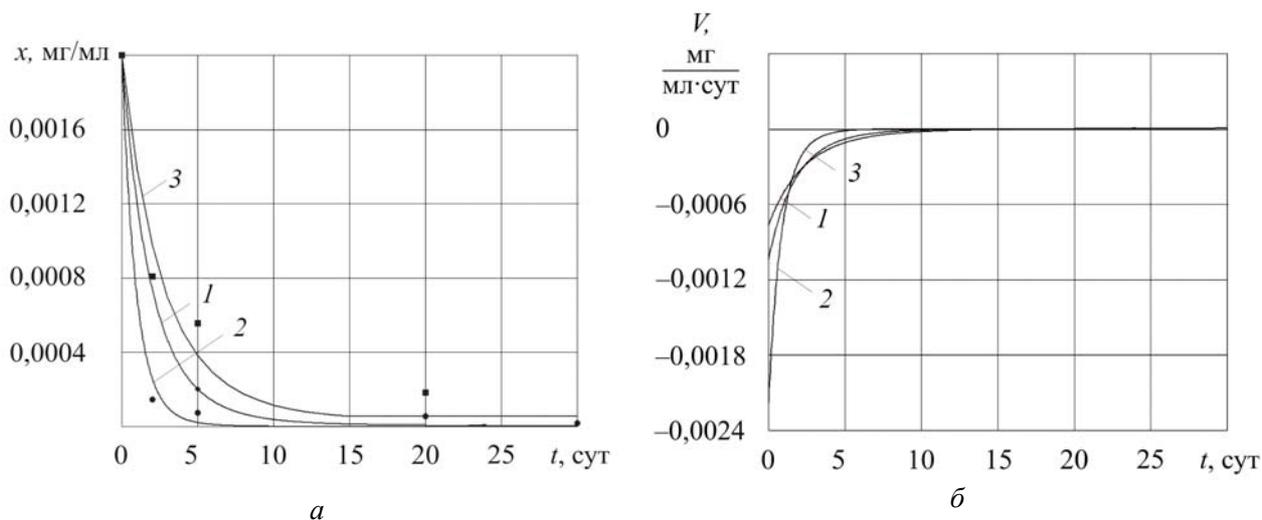


Рис. 1. Реализации случайного процесса биологической деструкции при экспериментах на повторяемость после кинетического моделирования: • – экспериментальные точки; $n = 1, 2, 3$ – номер эксперимента

Как следует из рис. 1, a , кинетические кривые достаточно адекватно описывают эксперименты на повторяемость изменения концентрации дротаверина гидрохлорида при биодеструкции. Интересен тот факт, что на момент времени $t = 2$ сут кривые реализации скорости биодеструкции пересекаются приблизительно в одной точке при $v = -0,0004$ мг/(мл · сут), т.е. скорость процесса в это время примерно одинакова во всех реализациях (рис. 1, $б$).

Естественно, необходимо количество реализаций числом значительно больше, чем три. Однако стоимость насыщения экспериментальными данными табл. 1 высока, поэтому приходится ограничиваться реальным минимумом из трех реализаций случайного процесса.

ЧИСЛОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИСТЕМЫ ДВУХ СЛУЧАЙНЫХ ВЕЛИЧИН

Как отмечено ранее, наблюдается значительный разброс результатов при исследовании повторяемости процесса биологической деструкции дротаверина гидрохлорида при фиксированных параметрах экспериментов, из-за чего его можно признать случайным.

В процессах биодеструкции монотонно убывающую (вернее, невозрастающую) функцию для каждой реализации $x(t)$, которая напоминает спадающую экспоненту (первый порядок кинетического уравнения), можно описать двумя параметрами: a – ускорение, b – скорость константы скорости реакции из кинетики химических процессов. При постоянной величине ускорения константа скорости реализации случайного процесса примет вид линейной зависимости от времени $k(t) = at + b$ в уравнении (1), где a и b – неслучайные величины.

Для случайного процесса, включающего все реализации, ускорение a и скорость процесса b приобретают смысл случайных величин A и B .

Числовые характеристики системы двух случайных величин A и B определяются следующими выражениями [13]:

$$\text{средние выборки} \quad \bar{a} = \frac{\sum_{i=1}^3 a_i}{n}, \quad \bar{b} = \frac{\sum_{i=1}^3 b_i}{n}; \quad (3)$$

$$\text{выборочная дисперсия} \quad S_a^2 = \frac{\sum_{i=1}^3 (a_i - \bar{a})^2}{n-1}, \quad S_b^2 = \frac{\sum_{i=1}^3 (b_i - \bar{b})^2}{n-1}; \quad (4)$$

$$\text{стандартное отклонение} \quad S_a = \sqrt{S_a^2}, \quad S_b = \sqrt{S_b^2}; \quad (5)$$

$$\text{корреляционная матрица} \quad K = \begin{pmatrix} S_a^2 & K_{ab} \\ K_{ab} & S_b^2 \end{pmatrix}, \quad K_{ab} = \frac{\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 (a_i - \bar{a})(b_j - \bar{b})}{n-1}. \quad (6)$$

Результаты расчета числовых характеристик системы двух случайных величин A и B таковы: $\bar{a} = -0,03794$ 1/сут², $\bar{b} = 0,6638$ 1/сут, $S_a^2 = 0,00089336$ 1/сут⁴, $S_b^2 = 0,14032193$ 1/сут², $K_{ab} = 0$. Следует обратить внимание на равенство нулю значения члена корреляционной матрицы, что отражает некоррелированность случайных величин A и B .

ПОВТОРЯЕМОСТЬ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕКТРУКЦИИ КАК СЛУЧАЙНОГО ПРОЦЕССА

Нестационарный случайный процесс данного класса можно свести к функции системы двух случайных величин вместо функции (в виде ряда) системы бесконечного числа пар некоррелированных случайных величин с нулевыми математическими ожиданиями и одинаковыми для пар дисперсиями согласно методу канонического разложения нестационарного случайного процесса Пугачева [11].

Следует подчеркнуть, что нестационарный случайный процесс сводится к элементарной функции системы двух случайных величин, а не к функции одной пары некоррелированных случайных величин с нулевыми математическими ожиданиями и одинаковыми для пары дисперсиями. В случае коррелированности в дисперсии учитывается слагаемое с корреляционным моментом K_{ab} .

Если в качестве определяющего параметра для случайного процесса повторяемости экспериментов по биологической деструкции выбрать концентрацию $x(t)$ утилизируемого лекарственного средства, то как среднее арифметическое можно получить математическое ожидание $m_x(t)$ изменения концентрации. Для того чтобы охарактеризовать разброс реализаций, необходимо определение дисперсии $D_x(t)$ и среднего квадратичного отклонения $\sigma_x(t)$.

При малом числе реализаций и малом количестве точек во времени в качестве математического ожидания m_x используется среднее значение \bar{x} , в качестве дисперсии D_x – выборочная дисперсия S_x^2 , а в качестве среднего квадратичного отклонения σ_x – стандартное отклонение S_x .

Если в зависимости реализаций (2) под a и b понимать случайные величины A и B , тогда можно записать аналогичное выражение для рассматриваемого случайного процесса:

$$X(t) = x_0 \cdot \exp(-(B + At/2)t). \quad (7)$$

Зависимость $X(t)$ от системы двух случайных величин A и B является экспоненциальной, поэтому ее можно линеаризовать в достаточно малой окрестности средних выборки \bar{a} и \bar{b} , тогда среднее выборки (аналог математического ожидания) случайного процесса определится той же самой функциональной зависимостью (7) (время t при этом является параметром) [11]

$$\bar{x}(t) = x_0 \cdot \exp(-(\bar{b} + \bar{a}t/2)t). \quad (8)$$

Отметим, что для полной информации о процессе необходима корреляционная функция $K_x(t, t')$, определение которой представляет технические сложности из-за ограниченного количества экспериментальных данных и требует в данном подходе информации о законах распределения случайных величин на входе и определяющего параметра случайного процесса.

Корреляционная функция случайного процесса $K_x(t, t')$ в рамках данной работы пока не интересует, остается вопрос о характеристиках разброса реализаций случайного процесса относительно среднего значения $\bar{x}(t)$, т.е. о выборочной дисперсии $S_x^2(t)$ и о стандартном отклонении $S_x(t)$ в качестве функций времени.

Выборочная дисперсия линеаризованной функции системы двух некоррелированных случайных величин согласно $K_{ab} = 0$ принимает вид [11]

$$S_x^2 = \sum_{i=1}^2 \left(\frac{\partial x}{\partial z_i} \right)_{\bar{a}, \bar{b}}^2 S_{z_i}^2, \quad i = 1, 2; \quad z_1 = a, z_2 = b, \quad (9)$$

откуда определяется стандартное отклонение $S_x(t)$.

Для рассматриваемого моделирования нестационарного случайного процесса с применением кинетических уравнений первого порядка зависимость выборочной дисперсии от времени такова:

$$S_x^2(t) = \bar{x}^2(t) t^2 (S_b^2 + t^2 \cdot S_a^2 / 4), \quad (10)$$

откуда следует выражение для стандартного отклонения

$$S_x(t) = \bar{x}(t) t (S_b^2 + t^2 \cdot S_a^2 / 4)^{0,5}, \quad (11)$$

где выборочные дисперсии S_a^2 , S_b^2 определяются выражением (4), а среднее реализаций $\bar{x}(t)$ – выражением (8).

В результате получены линеаризованные аналитические выражения для среднего выборки, выборочной дисперсии и стандартного отклонения как функций времени для рассматриваемого нестационарного процесса $X(t)$ биологической деструкции дротаверина гидрохлорида при экспериментах на повторяемость.

В качестве развития идеи о применении кинетического моделирования при исследовании данного случайного процесса следует отметить, что изменение скорости нестационарного процесса $X(t)$ со временем также является случайным процессом $V(t)$. В качестве определяющего процесс параметра в этом случае можно выбрать скорость изменения концентрации дротаверина гидрохлорида $v(t)$ в процессе биологической деструкции.

При анализе экспериментов на повторяемость биологической деструкции помимо среднего значения концентрации $\bar{x}(t)$, выборочной дисперсии $S_x^2(t)$ и стандартного отклонения $S_x(t)$ нестационарного случайного процесса $X(t)$ исследователей интересуют вероятностные характеристики скорости $V(t)$ этого процесса. Это среднее значение скоростей реализаций $\bar{v}(t)$, выборочная дисперсия $S_v^2(t)$ и стандартное отклонение $S_v(t)$. Реализации скоростей биологической деструкции (см. рис. 1, б) представлены выражением (1), где коэффициенты a и b определены в табл. 2, а $x(t)$ – известные функции из выражения (2).

Повторив процедуру линеаризации для скорости биологической деструкции, выбранной в качестве определяющего процесс параметра, получим среднее значение реализаций

$$\bar{v}(t) = -(\bar{b} + \bar{a}t) \bar{x}(t) = -(\bar{b} + \bar{a}t) x_0 \exp[-(\bar{b} + \bar{a}t)], \quad (12)$$

выборочную дисперсию

$$S_v^2(t) = \bar{x}^2(t) \left(t^2 \left(\frac{1}{2}(\bar{b} + \bar{a}t)t - 1 \right)^2 S_A^2 + ((\bar{b} + \bar{a}t)t - 1)^2 S_B^2 \right) \quad (13)$$

и среднее отклонение для скорости этого процесса

$$S_v(t) = \bar{x}(t) \left(t^2 \left(\frac{1}{2}(\bar{b} + \bar{a}t)t - 1 \right)^2 S_A^2 + ((\bar{b} + \bar{a}t)t - 1)^2 S_B^2 \right)^{0,5}. \quad (14)$$

На рис. 2 приведены зависимости выборочных дисперсий случайного процесса биологической деструкции дротаверина гидрохлорида от времени при экспериментах на повторяемость: a – для концентрации субстрата; b – для скорости изменения концентрации.

Выборочная дисперсия $S_x^2(t)$ определяет разброс значений концентраций при реализациях случайного процесса, кривая на рис. 2, а имеет максимум при $t = 2$ сут, что соответствует наибольшему разбросу реализаций (рис. 1, а).

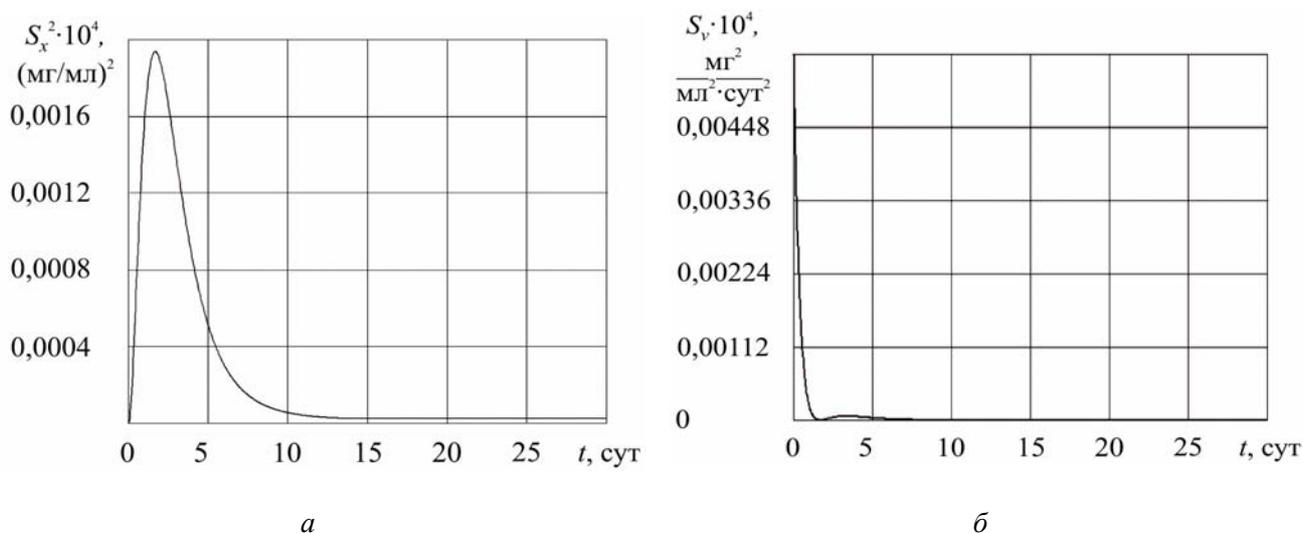


Рис. 2. Зависимости выборочных дисперсий случайного процесса биологической деструкции дротаверина гидрохлорида от времени при экспериментах на повторяемость: a – для концентрации субстрата; b – для скорости изменения концентрации

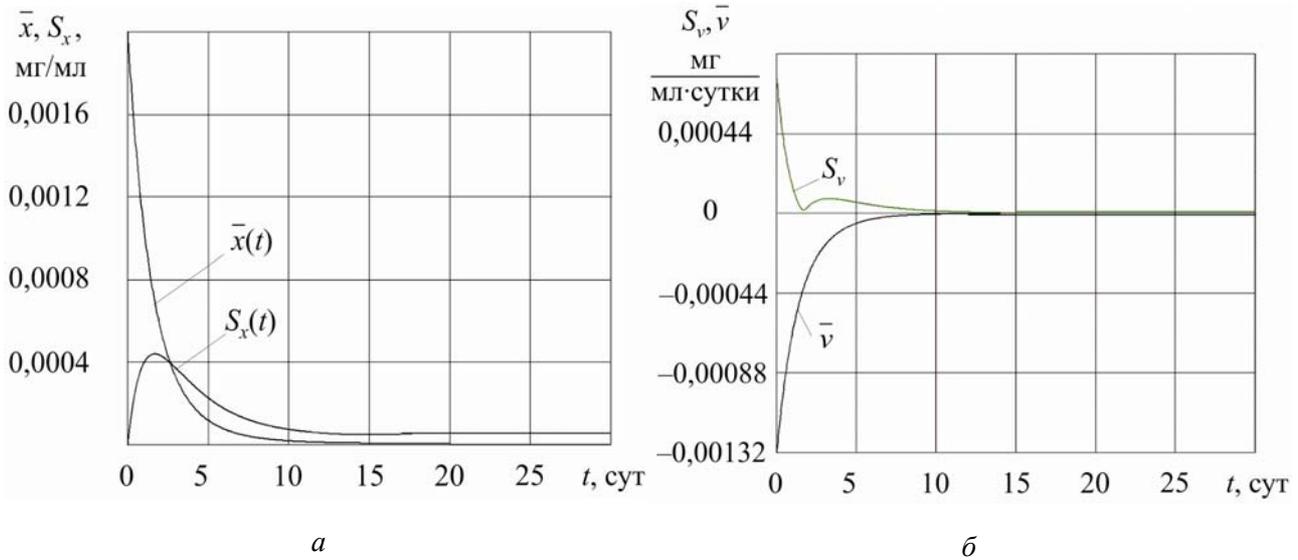


Рис. 3. Зависимости от времени средних значений $\bar{x}(t)$, $\bar{v}(t)$ и стандартных отклонений $S_x(t)$, $S_v(t)$ случайного процесса биологической деструкции дротаверина гидрохлорида при экспериментах на повторяемость: *a* – для концентрации субстрата; *б* – для скорости изменения концентрации в качестве определяющего параметра

Для случайного процесса скорости изменения концентрации в качестве определяющего параметра в этот момент времени наблюдается практически нулевое значение $S_v^2(t)$ выборочной дисперсии (рис. 2, *б*), так как здесь почти нет разброса значений скорости изменения концентрации (см. рис. 1, *б*), т.е. кривые реализаций скорости процесса пересекаются практически в одной точке.

Однако из-за несоответствия единиц измерения среднего выборки и выборочной дисперсии их сравнительный анализ затруднен, поэтому в качестве характеристики разброса реализаций лучше использовать стандартные отклонения $S_x(t)$ и $S_v(t)$.

На рис. 3 приведены зависимости средних выборки и стандартных отклонений случайного процесса биологической деструкции дротаверина гидрохлорида от времени при экспериментах на повторяемость: *a* – для концентрации субстрата; *б* – для скорости изменения концентрации в качестве определяющего параметра.

Максимумы и минимумы стандартных отклонений соответствуют значениям выборочных дисперсий при $t=2$ сут на рис. 2, при $t=3$ сут наблюдается локальный максимум стандартного отклонения $S_v(t)$.

О качестве повторяемости экспериментов по биологической деструкции можно судить по соотношению стандартного отклонения среднего результата и среднего выборки – коэффициенту вариации, % [13]

$$S_{\bar{x}}(t) = 100 S_x(t) / (n^{0.5} \bar{x}), \quad (15)$$

где в нашем случае $n = 3$.

Коэффициенты вариации интересуют в точках максимумов стандартного отклонения. Коэффициенты вариации для концентрации: $S_{\bar{x}}(2) = 31,3\%$; для скорости изменения концентрации: $S_{\bar{v}}(0) = 31,7$ и $S_{\bar{v}}(3) = 31,0\%$. Значения коэффициентов вариации достаточно большие, поэтому повторяемость данного процесса неустойчива при оценках по концентрации и по скорости ее изменения.

Ранее не предполагался тип закона распределения системы двух случайных величин, определяющий случайный процесс биологической деструкции. Числовые характеристики нестационарного случайного процесса (среднее выборки, выборочная дисперсия, стандартное отклонение и коэффициенты вариации) были определены путем линеаризации неслучайной функции этой системы. Случайные величины оказались некоррелированными. Однако для данного подхода к вероятностному анализу нестационарного случайного процесса путем представления его функцией системы двух случайных величин, полученных на основе кинетического моделирования, этот факт является несущественным.

Для нахождения областей реализаций процесса биологической деструкции с определенной вероятностью при повторном эксперименте хотелось бы применить известное правило трех сигм, которое, к сожалению, оправдано только при нормальном законе распределения системы случайных величин. Из-за малого числа реализаций случайного процесса затруднительно использовать известные методы идентификации интересующего закона распределения, поэтому примем гипотезу о нормальном законе априори.

При этом следует отметить тот факт, что будут использованы линеаризованные числовые характеристики случайного процесса, что подразумевает при экспоненциальных зависимостях реализаций от времени определенные ограничения на дисперсию.

На рис. 4 приведены области изменения во времени концентраций дротаверина гидрохлорида в процессе биологической деструкции при экспериментах на повторяемость с заданной вероятностью (показаны затемнением).

Затемненные области реализаций рассматриваемого варианта биологической деструкции расширяются с ужесточением требуемой вероятности реализации. Однако высокое значение коэффициента вариации предопределило нереальную область отрицательной концентрации для вероятности 68,2% (рис. 4, а), для 95,4%-ной вероятности незначительное увеличение концентрации выше начальной и весьма большую область отрицательной концентрации (рис. 4, б), а при 97,8%-ной вероятности значительное увеличение концентрации выше начальной и большую область отрицательной концентрации (рис. 4, в).

На рис. 5 приведены области реализаций скоростей изменения концентраций дротаверина гидрохлорида во времени в процессе биологической деструкции при экспериментах на повторяемость с заданной вероятностью (показаны затемнением).

Для вероятности 68,2% определение области реализаций скорости процесса при гипотезе нормального распределения не вызывает сомнений (рис. 5, а). Погрешность при вероятности 95,4% появилась из-за того, что значение скорости биологической деструкции стало положительным (рис. 5, б). Это означает нереальное увеличение концентрации. Для вероятности 97,8% наблюдается значительная область реализаций с повышением концентрации (рис. 5, в), что невозможно для данного процесса.

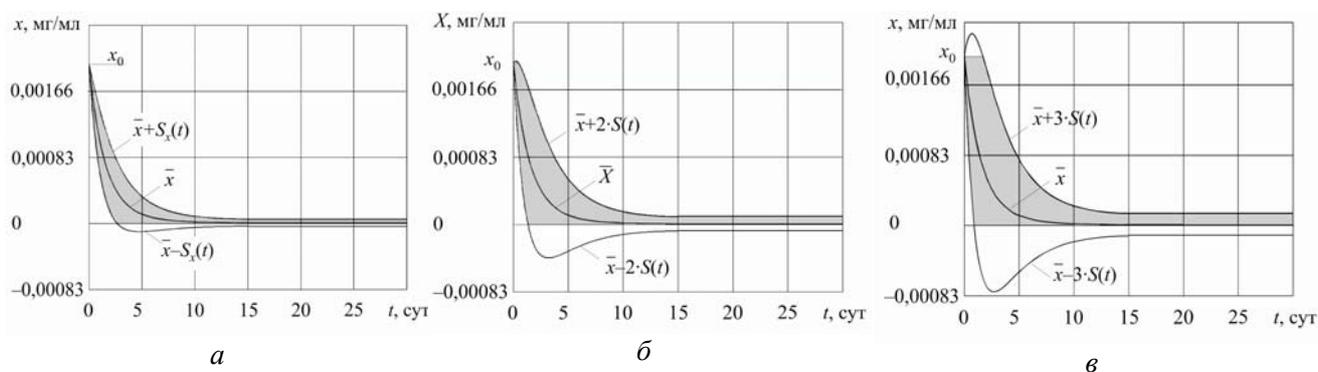


Рис. 4. Области изменения во времени концентраций дротаверина гидрохлорида при биодеструкции в экспериментах на повторяемость с вероятностью: а – 68,2%; б – 95,4%; в – 97,8%

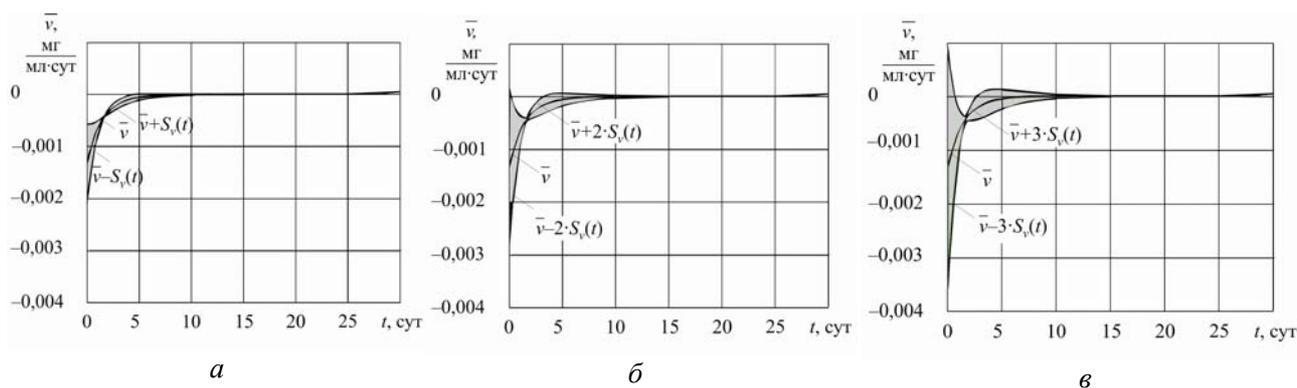


Рис. 5. Области реализаций во времени скоростей изменения концентрации дротаверина гидрохлорида при биодеструкции в экспериментах на повторяемость с вероятностью: $a - 68,2\%$; $b - 95,4\%$; $v - 97,8\%$

В результате для областей реализаций по концентрации и по скорости изменения концентрации нормальный закон распределения системы двух случайных величин применен в усеченном виде, что несколько завысило вероятности попадания повторных реализаций процесса в области, представленные на рис. 4 и 5.

Анализ полученных результатов позволяет сделать ряд замечаний.

В первую очередь следует отметить, что формальное, т.е. без осмысливания поведения кинетических кривых, моделирование может привести к нереальным результатам типа отрицательного значения квадратного корня для положительной величины. Ускорение изменения константы реакции a принимает для данного процесса отрицательное значение. Это приводит с момента времени порядка 30 сут (в конце процесса биологической деструкции) к незначительному увеличению расчетного значения концентрации дротаверина гидрохлорида в качестве исходного субстрата при биологической деструкции, что невозможно. Математический эффект связан с изменением знака в показателе экспоненты с отрицательного на положительный. В результате необходима коррекция кинетической кривой – по истечении 30 сут концентрация дротаверина гидрохлорида постоянна.

Отсюда следует второе замечание. Формальное применение пакетов программ для стохастического анализа, особенно при использовании в качестве исходной числовой информации, без углубленного анализа результатов является некорректным.

В качестве третьего замечания следует вернуться к правилу трех сигм. Не касаясь вопроса обоснования правомерности гипотезы о нормальном законе распределения случайной величины на фиксированный момент времени, следует обратить внимание на то, что добавление к математическому ожиданию даже одной сигмы может вывести случайный процесс за пределы реально возможных реализаций. В рамках данного исследования биологической деструкции области реализаций не имеют гладких границ, так как концентрация исходного субстрата не может возрасти и не может стать меньше нуля.

Определение для биологической деструкции в качестве случайного процесса числовых характеристик интересуют при наборе статистики по отработанным методически процессам (*in vitro*), т.е. после их окончания.

Выводы

1. Биомеханические процессы, связанные с биологическими системами и человеческим организмом, в силу множества факторов, определяющих их развитие со временем, являются по сути случайными. С позиций биомеханического и стохастического анализа таких процессов целесообразно применение кинетического моделирования, которое позволяет совершенствовать постановки задач биомеханики и производить аналитический стохастический анализ этих процессов.

2. В данной работе сделан акцент на проведение анализа нестационарного случайного процесса при экспериментах на повторяемость биологической деструкции дротаверина гидрохлорида как обычной функции системы двух случайных величин с применением кинетического моделирования реализаций процесса. Недостаток экспериментальных точек на фиксированные моменты времени при некоторых реализациях (см. табл. 1) восполняется за счет кинетического моделирования. В результате при любом фиксированном времени имеется сечение случайного процесса с числом случайных величин, равным числу реализаций.

3. Для нестационарного случайного процесса биологической деструкции при экспериментах на повторяемость в условиях данных табл. 1, моделируемых кинетическими уравнениями первого порядка с линейно изменяющейся константой реакции, получены аналитические зависимости числовых характеристик от времени.

4. При гипотезе нормального закона распределения определены области повторных реализаций с заданной вероятностью изменения концентрации дротаверина гидрохлорида и скорости изменения его концентрации в процессе биологической деструкции. Показано завышение значений вероятности для приведенных областей реализаций, полученных на основе нормального закона распределения.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность за помощь в обсуждении результатов исследований заведующему кафедрой теоретической механики Пермского национального исследовательского политехнического университета д.т.н., профессору Ю.И. Няшину.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранова А.А., Селянинов А.А., Вихарева Е.В. Кинетическое моделирование биомеханических процессов // Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Механика. – 2012. – № 3. – С. 7–25.
2. Вихарева Е.В., Селянинов А.А. Кинетическая модель процесса биодеструкции *n*-аминофенола // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – № 12. – С. 29–33.
3. Вихарева Е.В., Селянинов А.А., Данилов Ю.Л., Рудакова И.П., Нечеухина Т.А., Ившина И.Б., Няшин Ю.И. Математическая модель процесса биодеструкции парацетамола как открытой системы // Российский журнал биомеханики. – 2008. – Т. 12, № 2. – С. 41–54.
4. Вихарева Е.В., Селянинов А.А., Ившина И.Б., Няшин Ю.И. Математическое моделирование процесса биодеструкции парацетамола актинобактериями рода *Rhodococcus* // Российский журнал биомеханики. – 2007. – Т. 11, № 2. – С. 93–100.
5. Вихарева Е.В., Селянинов А.А., Няшин Ю.И., Ившина И.Б. Кинетическая схема процесса биодеструкции парацетамола с истекшим сроком годности // Российский журнал биомеханики. – 2006. – Т. 10, № 3. – С. 72–79.
6. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – С. 143–145.
7. Иванова Н.А., Разепина Я.А., Самбулова А.А., Баранова А.А., Селянинов А.А., Вихарева Е.В., Сульдин А.В. Выбор оптимального состава мягких желатиновых капсул с использованием нормированной целевой функции // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. – № 3/1 (37). – С. 81.
8. Каталог штаммов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / под ред. И.Б. Ившиной. – М.: Наука, 1994. – 163 с.
9. Куюкина М.С., Ившина И.Б., Осипенко М.А., Няшин Ю.И., Тюленева А.Н., Серебренникова М.К. Об учете формы свободной поверхности жидкости при моделировании процесса иммобилизации бактериальных клеток на твердом носителе // Российский журнал биомеханики. – 2009. – Т. 13, № 2. – С. 7–14.
10. Селянинов А.А. Класс кинетически моделируемых биомеханических случайных процессов // Российский журнал биомеханики. – 2012. – Т. 16, № 4. – С. 22–35.
11. Селянинов А.А. Статистическая механика и теория надежности. – Пермь: Изд-во Перм. гос. техн. ун-та, 2008. – 201 с.

12. Селянинов А.А., Вихарева Е.В. Кинетика биодеструкции лекарственных средств – производных фенола, изохинолина и карбоновых кислот // Российский журнал биомеханики. – 2010. – Т. 14, № 2. – С. 79–91.
13. Чарыков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа. – Л.: Химия, 1984. – 168 с.

STOCHASTIC ANALYSIS OF REPEATABILITY OF THE PROCESS OF BIOLOGICAL DESTRUCTION OF DROTAVERINE HYDROCHLORIDE

A.A. Selyaninov, E.V. Vikhareva, I.B. Ivshina, A.A. Baranova, Yu.N. Karpenko
(Perm, Russia)

The process of biological destruction has a biomechanical nature since the supply of nutrient substrates toward the immobilised actinobacteria colonies is performed mechanically with vigorous stirring of the culture fluid in an orbital shaker. By virtue of many factors influencing, the course of the process as well as the impossibility to describe quantitatively the interconnections of these factors with the result of the process as functions of time, the process of biological destruction presents a non-stationary random one. As a result, we have a real problem to analyse stochastically the repeatability of the processes of biological degradation in the laboratory, interlaboratory and especially in industrial environments. Being considered (*in vitro*), the results of experiments on the repeatability show that the process of biological degradation of drotaverine hydrochloride with using actinobacteria is a non-stationary stochastic process that allows us to attribute it to the class of kinetically simulated biomechanical random processes. The main features of this class are the certain monotony in increasing or decreasing the characteristic parameter of the process, and the availability of modern methods of its registration. That allows performing a kinetic simulation of the random process realisations. As a result, the non-stationary random process is reduced to a non-random function of two random variables. The realisations of stochastic process of drotaverine hydrochloride biological destruction using actinobacteria are simulated by the first order kinetic equations with a linearly varying reaction factor. The time dependences of the mathematical expectation, variance, and standard deviation were derived analytically from experiments on the repeatability of the process of biological destruction. In addition, the areas of realisations were identified at repeating under the hypothesis of a normal distribution of the system of random variables in each section of the process. In these areas, we may predict with a certain probability the course of the process in time.

Key words: drotaverine hydrochloride, repeatability of biodestruction, kinetic simulation, non-stationary biomechanical random process, function of two random variables, stochastic analysis, areas of realisations.

Получено 11 января 2013