

ОЦЕНКА ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ВВЕДЕНИЯ ЦИСПЛАТИНА В ГИДРОГЕЛЬ С ПРОСПИДИНОМ ДЛЯ ВНУТРИБРЮШИННОЙ ТЕРАПИИ

М.Ю. Ревтович¹, Ю.П. Истомин¹, О.В. Красько², Е.М. Трещалина³, А.И. Шмак¹,
П.М. Бычковский⁴, Т.Л. Юркштович⁵, Н.В. Голуб⁵, С.О. Соломевич⁵, Ю.И. Рогов⁶

¹Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова;
Республика Беларусь, 223040 Минск, агрогородок Лесной;

²Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси; Республика Беларусь, 220012 Минск, ул. Сурганова, 6;

³ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

⁴Учебно-научно-производственное республиканское унитарное предприятие «Унитехпром БГУ»;

Республика Беларусь, 220108 Минск, ул. Курчатова, 1;

⁵Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета;
Республика Беларусь, 220030 Минск, ул. Ленинградская, 14;

⁶ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»;

Республика Беларусь, 220013 Минск, ул. П. Бровки, 3, корп. 3

Контакты: Михаил Юрьевич Ревтович mihail_revtovich@yahoo.com

Введение. Ранее было показано, что гидрогель (ГГ) на основе фосфата декстрана повышает эффективность цисплатина (ЦП) и особенно проспицина (Пр), который при внутрибрюшинной (в/б) терапии асцитной гепатомы Зайделя (АГЗ) дает длительную полную ремиссию (ПР) асцита. Выдвинуто предположение, что двойная композиция (ГГ/Пр/ЦП) приведет к повышению эффективности в/б терапии опухоли, чувствительной к обоим цитостатикам.

Цель исследования — оценка возможности повышения эффективности в/б терапии АГЗ ГГ с Пр и ЦП.

Материалы и методы. Использовано 55 аутобредных белых крыс с АГЗ ($n = 7-10$), которым в/б однократно введен ГГ/Пр/ЦП с Пр в дозах 250 или 500 мг/кг и ЦП в дозах 3,0 или 5,5 мг/кг. Группы сравнения получали ГГ/Пр в адекватных дозах. Для оценки эффективности выбран наиболее значимый показатель — число ПР по накоплению асцита (контрольный срок — 42 дня) с оценкой снижения относительного риска (модель пропорциональных рисков Кокса) и кумулятивной выживаемости.

Результаты. Показано, что ГГ/Пр/ЦП и ГГ/Пр при максимальных дозах цитостатиков равноэффективны на этой модели, ПР = 100 %. Уменьшение дозировки Пр до 250 мг/кг сопровождалось снижением эффективности вплоть до ПР = 0, но добавление ЦП приводило к ПР = 43–70 % с дозозависимым увеличением кумулятивной выживаемости до $p_{\log\text{-rank}} = 0,004$. Переносимость эффективного лечения была удовлетворительной.

Заключение. На крысах с АГЗ двойная композиция ГГ/Пр/ЦП с Пр в высокой терапевтической дозе 500 мг/кг равноэффективна ГГ/Пр 500 мг/кг, что не дает возможности оценить терапевтический выигрыш при добавлении ЦП. При субтерапевтической дозе Пр, составляющей 250 мг/кг, двойная композиция с ЦП обеспечивает развитие ПР у части крыс. Полученные данные подтверждают значение ГГ/Пр для в/б терапии опухолевых поражений брюшной полости человека, для которого ГГ/ЦП выступает в качестве адъюванта.

Ключевые слова: гидрогелевая форма, цисплатин, проспицин, противоопухолевая активность, асцитная гепатома

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-30-35

VALUE OF RATIONALITY CISPLATIN ADDITION INTO PROSPIDIN HYDROGEL FOR INTRAPERITONEAL CHEMOTHERAPY OF ZAJDEL HEPATOMA

M.Yu. Reutovich¹, Yu.P. Istomin¹, O.V. Krasko², H.M. Treshalina³, A.I. Shmak¹,
P.M. Bychkovsky⁴, T.L. Yurkshovich⁵, N.V. Golub⁵, S.O. Solomevich⁵, Y.I. Rogov⁶

¹N.N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus; Settlement Lesnoy, Minsk 223040, Belarus;

²United Institute of Informatics Problems National Academy of Sciences of Belarus; 6 Sarganova Str., Minsk 220012, Belarus;

³N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashyrskoe sh., Moscow 115478, Russia;

⁴Educational and Scientific Production Republican Unitary Enterprise «Unitehprom BSU»;
1 Kurchatova Str., Minsk 220108, Belarus;

⁵Research Institute for Physical Chemikal Problem of the Belarusian State University;
14 Leningradskaya Str., Minsk 220030, Belarus;

⁶Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education; building 3, 3 P. Brovki Str., Minsk 220013, Belarus

Introduction. Earlier it has been shown that the hydrogel (HG) on the basis of the dextran phosphate (DP) increases effectivity of cisplatin (CDDP) and especially prospidin (Pr) which at intraperitoneal (i.p.) therapy of the rat Zajdel ascite hepatoma (ZAH) the long-lived the complete remission (CR) of an ascites. It was assume that addition of the CDDP to HG/Pr with receiving double composition (HG/Pr/CDDP) can lead to increase its efficacy.

The purpose of research — the assessment of a possibility to increasing of efficacy i.p. therapy of an ZAH by the HG with Pr and CDDP.

Materials and methods. It was used 55 white outbreed rats with ZAH ($n = 7-10$) by which obtained i.p. single therapy with HG/Pr/CDDP in doses for Pr of 250 or 500 mg/kg and for CDDP of 3.0 of 5.5 mg/kg. Groups of comparison received HG/Pr in adequate doses. For assessment of effectivity the most significant index — number of the CR on accumulation of an ascites (control time — 42 days) with assessment of decrease in the relative risk (Cox model of proportional risks) and cumulative survival was chosen.

Results. It is shown that efficacy of HG/Pr/CDDP when Pr was used in maximal doses of 500 mg/kg was equal to HG/Pr, CR = 100 % against this model. When it was used Pr with subtherapeutic dose of 250 mg/kg CR = 0, but addition of the HG/CDDP led to CR = 50–70 % with depended on dose, and simultaneously with increase in cumulative survival up to $p_{\log\text{-rank}} = 0,004$. The good tolerance of all therapeutic systems was evaluated.

Conclusion. In rats with ZAH, a double composition of HG/Pr/CDDP in a high therapeutic dose for Pr of 500 mg/kg is equally effective with HG/Pr in dose of 500 mg/kg, which makes it impossible to evaluate the therapeutic gain of adding CDDP. At a subtherapeutic dose for Pr of 250 mg/kg, a double composition with CDDP provides CR in a part of the rats. The obtained data confirm the importance of HG/Pr for intraperitoneal therapy of tumoral lesions of the human abdominal cavity, for which HG/CDDP acts as an adjuvant.

Key words: prolonged hydrogel form, prospidin, cisplatin, antitumor activity, ascites hepatoma

Введение

Одной из составляющих комплекса лечебных мероприятий при лечении и профилактике канцероматоза после радикального хирургического лечения является интраперитонеальная (внутрибрюшинная, в/б) химиотерапия, эффективность которой зависит от длительности экспозиции цитостатика в брюшной полости, что реализуется путем использования различных гидрогелей (ГГ) [1–5].

Среди полимеров медицинского назначения особое место занимают препятствующие агрегации опухолевых клеток малотоксичные природные биосовместимые полисахариды с приемлемой скоростью биodeградации. Прежде всего это эфиры декстрана и крахмала, рекомендованные для использования в качестве полимеров-носителей для иммобилизации и контролируемого выделения лекарственных веществ [6]. Декстран — водорастворимый полисахарид, содержащий остатки D-глюкозы преимущественно с α -1,6-D-гликозидной связью и меньше — с α -1,2- и α -1,3-гликозидными связями, что свойственно фосфату декстрана (ФД). Их использование позволяет создать соответствующую макромолекулярную терапевтическую систему, обеспечивающую пролонгированное высвобождение и длительное сохранение высоких концентраций лекарственного средства в брюшной полости.

Для получения пролонгированной формы нами апробирован ГГ с ФД, в котором путем этерификации часть гидроксильных групп полисахарида замещена фосфорнокислыми группами [2]. При в/б терапии асцитной гепатомы Зайделя (АГЗ) искомым эффект показали ГГ на основе ФД с проспирином (ГГ/Пр) и цисплатином (ГГ/ЦП) [2, 3]. Более эффективным на этой модели был ГГ/Пр,

ингибирующий рост других асцитных опухолей [7]. Выдвинуто предположение, что двойная композиция (ГГ/Пр/ЦП) приведет к повышению эффективности в/б терапии опухоли, чувствительной к обоим цитостатикам.

Цель настоящего исследования — оценка возможности повышения эффективности в/б терапии АГЗ гидрогелевой композицией Пр с ЦП.

Материал и методы

Исследование специфической активности препаратов проведено на 55 белых аутбредных крысах с перевитой в/б АГЗ (культура получена из Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия). Животных содержали в виварии Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова на стандартной диете и обычном питьевом режиме. АГЗ трансплантировали в/б по 0,5 мл 5-дневного асцита. После трансплантации крыс делили на группы по 7–10 особей в каждой.

Через 24 ч после перевивки опухоли крысам вводили однократно в/б ГГ/Пр с Пр в дозах 250 или 500 мг/кг и двойную композицию ГГ/Пр/ЦП с Пр в дозах 250 или 500 мг/кг и ЦП в дозах 3,0 или 5,5 мг/кг.

Содержание ФД во всех образцах составляло 500 мг/кг. Для приготовления ГГ к навескам лиофильно высушенного порошка Пр и/или ЦП/ФД (получены из Научно-исследовательского института физико-химических проблем Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь) добавляли *ex tempore* стерильную дистиллированную воду. Исследуемые препараты вводили в объеме 1,25 мл на 100 г массы тела крысы (табл. 1).

Таблица 1. Схема эксперимента и дозы препаратов

№ группы	Группа	Доза препарата, мг/кг	
		ЦП	Пр
1	КРО	—	—
2	ГГ*/Пр	—	250
3	ГГ/Пр	—	500
4	ГГ/Пр/ЦП	3,0	500
5	ГГ/Пр/ЦП	5,5	500
6	ГГ/Пр/ЦП	3,0	250
7	ГГ/Пр/ЦП	5,5	250

Примечание. ГГ — гидрогель; Пр — проспидин; ЦП — цисплатин; КРО — контроль роста опухоли. *Доза фосфата декстрана = 500 мг/кг во всех прописях.

Ранее в эксперименте *in vitro* было продемонстрировано, что взаимодействие ФД с ЦП происходит в основном по механизму физической абсорбции, с Пр — по ионообменному и распределительному механизмам, а также по механизму физической абсорбции [8] (рис. 1).

На основании данных инфракрасной спектроскопии, неводного и потенциометрического титрований [4] сделан вывод о том, что при терапевтической дозе Пр в фазе катионита между ним и ФД реализуются различные типы взаимодействий (ионный обмен, молекулярное поглощение), при этом значительный

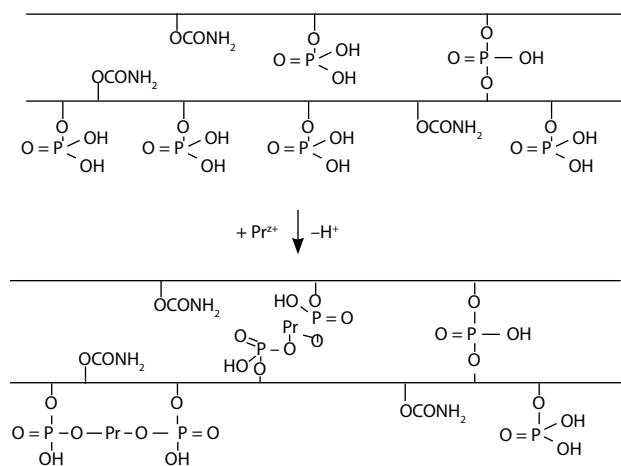


Рис. 1. Схема ионного обмена между проспидином и фосфатом декстрана

вклад (более 70 %) в суммарную сорбцию Пр ФД вносит молекулярное поглощение цитостатика.

Благодаря этому процесс высвобождения цитостатика из комплекса с ФД носит фазовый пролонгированный характер, что при проведении в/б химиотерапии может предоставить дополнительные преимущества в сравнении с водными растворами цитостатиков.

Для оценки противоопухолевого эффекта использован наиболее информативный критерий — полная ремиссия (ПР) [9], оцененная по числу крыс с асцитом через 42 дня после трансплантации

Таблица 2. Сравнительная эффективность двойной гидрогелевой композиции проспидина и цисплатина на модели асцитной гепатомы Зайделя

Группа, доза препарата (мг/кг)	Показатели эффективности			Критерии оценки статистической значимости различий (p)	
	Сроки гибели крыс, дни	ПР		Фишера	Логранговый с поправкой Бонферрони
		Число крыс	%*		
КРО	9, 9, 8, 8, 15, 15, 16, 17, 19 (n = 10)	0/10	0	—	—
ГГ/Пр ₅₀₀	—	10/10	100	<0,001	<0,001
ГГ/Пр ₅₀₀ /ЦП _{3,0}	28, 32 (n = 2)	5/7	71	0,003	<0,001
ГГ/Пр ₅₀₀ /ЦП _{5,5}	—	7/7	100	0,001	<0,001
ГГ/Пр ₂₅₀	13, 13, 15, 17, 21, 23, 24 (n = 7)	0/7	0	—	0,087
ГГ/Пр ₂₅₀ /ЦП _{3,0}	20, 21, 27, 42 (n = 4)	3/7	43	0,052	<0,001
ГГ/Пр ₂₅₀ /ЦП _{5,5}	15, 17, 39 (n = 3)	4/7	57	0,015	0,005

Примечание. ГГ — гидрогель; Пр — проспидин; ЦП — цисплатин; КРО — контроль роста опухоли; ПР — полная ремиссия, крысы без асцита на 42-е сутки опыта. *В группах с n = 7 расчет процента условный для упрощения обсуждения.

опухоли под контролем аутопсии и патоморфологической картины брюшной полости.

Для оценки статистической значимости различий в значениях ПР между опытными группами и группой контроля использовали критерий Фишера. Для оценки выживаемости использовался метод Каплана–Мейера, значимость различий оценивали с помощью логрангового критерия (log-rank test) с поправкой Бонферрони на множественные сравнения [10, 11]. О степени снижения рисков судили с помощью модели пропорциональных рисков Кокса, о значимости влияния фактора риска (исследуемых препаратов) на выживаемость – по критерию Вальда [12]. На основе коэффициентов регрессии рассчитывали снижение относительного риска (ОР), для чего вычисляли обратные экспоненцированные значения коэффициентов регрессии и доверительные интервалы на основе соответствующих доверительных интервалов коэффициентов регрессии аналогичным образом. Анализ данных выполнен с использованием статистического пакета R версии 3.1.1 (лицензия GNU GPL) [13]. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Исследования проведены в соответствии с техническим кодексом «Надлежащая лабораторная практика» Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 56 от 28.03.2008 г. и международными этическими и научными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных (Хельсинская декларация Всемирной медицинской ассоциации, 2000 г.).

Результаты и обсуждение

Показано, что эффективность ГГ/Пр зависит от величины примененной дозы Пр: при дозе 500 мг/кг ПР = 100 % против ПР = 0 % при дозе 250 мг/кг (табл. 2).

Кумулятивная выживаемость крыс после применения ГГ/Пр в сравнении с группой контроля роста опухоли (КРО) также дозозависимо возрастала, $p_{\log\text{-rank}} = 0,00001$ (рис. 2)

Двойная композиция ГГ/Пр₅₀₀/ЦП_{5,5} не давала преимуществ перед ГГ/Пр₅₀₀, поскольку в обоих случаях ПР составила 100 %, а при ГГ/Пр₅₀₀/ЦП₃ эффект был даже ниже: ПР = 71 % (у 5 из 7 крыс). Однако в случае применения композиции ГГ/Пр₂₅₀/ЦП_{3,0–5,5} с субтерапевтической дозой Пр эффект был достигнут, ПР составила 41–57 % (у 3–4 из 7 крыс) (табл. 2). Анализ кумулятивной выживаемости показал, что увеличение числа ремиссий под действием ГГ/Пр₂₅₀/ЦП_{3,0–5,5} сопровождалось статистически значимым ее увеличением, $p_{\log\text{-rank}} = 0,00001$ (рис. 3), в том числе и в сравнении с исходным ГГ/Пр₂₅₀, $p_{\log\text{-rank}} = 0,004$ (рис. 4).

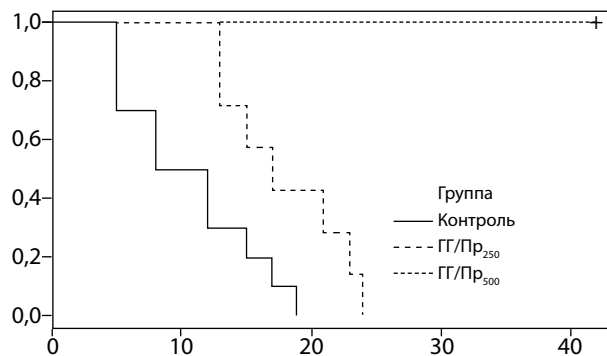


Рис. 2. Сравнительная выживаемость крыс с асцитной гепатомой Зайделя под действием гидрогеля с проспидином в диапазоне доз: ГГ – гидрогель, Пр – проспидин в дозах 500 мг/кг и 250 мг/кг

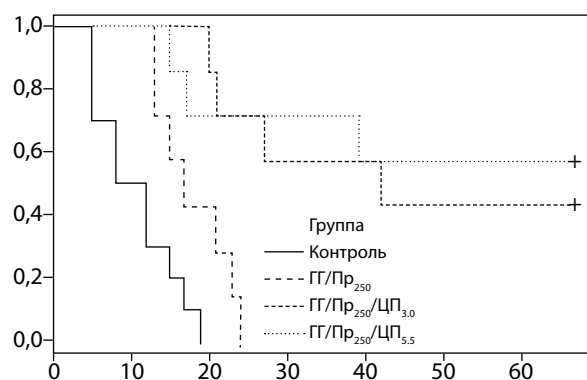


Рис. 3. Кумулятивная выживаемость крыс с асцитной гепатомой Зайделя под действием гидрогелевой композиции проспидина и цисплатина в диапазоне доз: ГГ – гидрогель, Пр – проспидин в дозе 250 мг/кг, ЦП – цисплатин в дозах 3,0 и 5,5 мг/кг

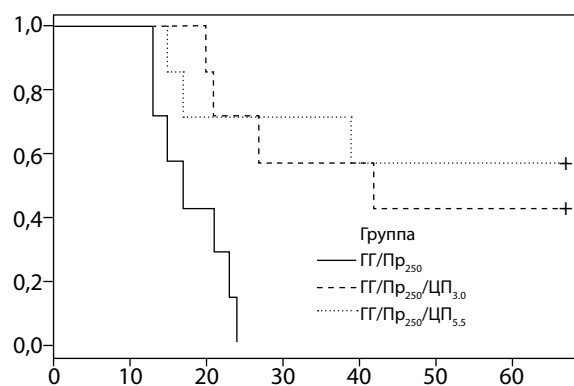


Рис. 4. Выживаемость крыс с асцитной гепатомой Зайделя под действием гидрогеля (ГГ) с проспидином (Пр) в дозе 250 мг/кг и гидрогелевой композиции проспидина в дозе 250 мг/кг с цисплатином в диапазоне доз 3,0–5,5 мг/кг

Регрессионный анализ на основе модели пропорциональных рисков Кокса подтвердил статистически значимое снижение риска летального исхода от прогрессирования опухолевого процесса при добавлении ЦП в двойную композицию ГГ/Пр₂₅₀/ЦП_{3,0–5,5} (табл. 3).

Таблица 3. Относительный риск наступления летального исхода от прогрессирования асцитной гепатомы Зайделя при внутрибрюшинном применении гидрогелевой композиции проспидина в дозе 250 мг/кг с цисплатином в диапазоне доз 3,0–5,5 мг/кг

Препарат, доза (мг/кг)	Регрессионный анализ			Вероятность ошибки p
	Коэффициент регрессии β	Стандартная ошибка	Снижение ОР, (95 % ДИ)	
ГГ/Пр ₂₅₀ /ЦП _{3,0}	–1,75	0,17	5,73 (1,42 ÷ 23,15)	0,014
ГГ/Пр ₂₅₀ /ЦП _{5,5}	–2,01	0,13	7,47 (1,61 ÷ 34,64)	0,010

Примечание. ГГ – гидрогель; Пр – проспидин; ЦП – цисплатин. ДИ – доверительный интервал; ОР – относительный риск.

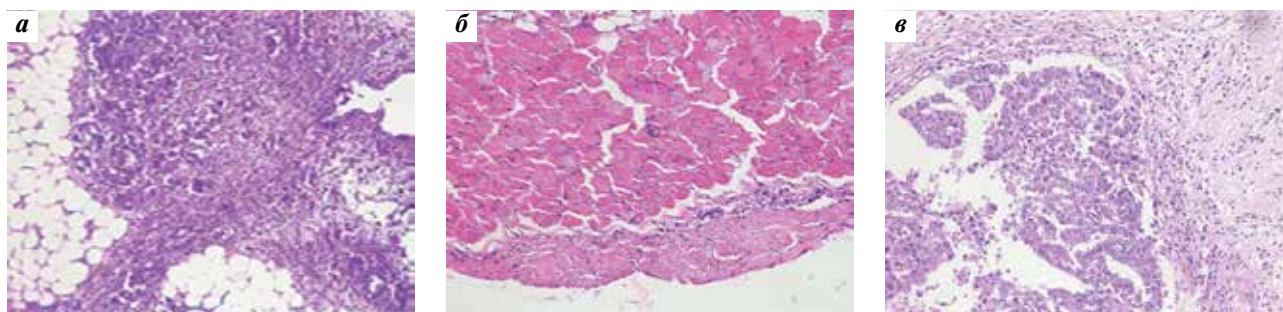


Рис. 5. Морфологические изменения в брюшной полости крыс с асцитной гепатомой Зайделя: большого сальника (группа контроля роста опухоли, без лечения) (а), брюшной стенки (гидрогелевая композиция проспидина в дозе 500 мг/кг с цисплатином в дозе 5,5 мг/кг, 42-е сутки) (б), брыжейки тонкой кишки (гидрогель с проспидином в дозе 250 мг/кг, 17-е сутки) (в). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

В/б применение комбинации ГГ/Пр₅₀₀/ЦП не сопровождалось изменением ОР летального исхода от АГЗ из-за высокой эффективности исходного ГГ/Пр₅₀₀, который не давал гибели животных (см. табл. 2).

Сравнительный анализ данных аутопсии и патоморфологического исследования органов брюшной полости показал следующее. В группе КРО без лечения у крыс выявлено $67,0 \pm 12,6$ мл асцита на фоне макроскопических признаков массивного спаечного процесса, гистологически – разрастания злокачественной опухоли аденокарциноматозного строения (рис. 5а). В группах, получивших лечебные композиции, сопровождавшиеся ПР = 100 %, подтверждено подавление асцита с развитием мелкоочаговой лимфоидной инфильтрации в субмезотелиальной волокнистой соединительной ткани брюшины, без признаков злокачественного роста (рис. 5б). В группе с неэффективным ГГ/Пр₂₅₀ отмечали спаечный конгломерат с асцитом среднего объема $36,4 \pm 7,1$ мл ($p = 0,056$ в сравнении с КРО). Применение ГГ/Пр₂₅₀/ЦП_{3,0} и ГГ/Пр₂₅₀/ЦП_{5,5} приводило к статистически значимому сокращению объема асцита в сравнении с КРО до $17,1 \pm 5,7$ мл ($p = 0,004$) и $15,7 \pm 5,3$ мл ($p = 0,003$) соответственно,

с уменьшением спаечного процесса на фоне идентичных ГГ/Пр₂₅₀ аденокарциноматозных разрастаний в брюшной полости (рис. 5в).

Заключение

Исследование показало, что ГГ/Пр/ЦП и ГГ/Пр при максимальных дозах цитостатиков равноэффективны на использованной модели, ПР = 100 %. Уменьшение дозировки Пр до 250 мг/кг сопровождалось снижением эффективности вплоть до ПР = 0 %, но добавление ЦП приводило к ПР = 43–71 % с дозозависимым увеличением кумулятивной выживаемости до $p_{\log\text{-rank}} = 0,004$. Переносимость эффективного лечения была удовлетворительной. Таким образом, на крысах с АГЗ двойная композиция ГГ/Пр/ЦП с Пр в высокой терапевтической дозе равноэффективна ГГ/Пр, что не дает возможности оценить терапевтический выигрыш при добавлении ЦП. При субтерапевтической дозе Пр двойная композиция с ЦП обеспечивает развитие ПР у части крыс. Полученные данные подтверждают значение ГГ/Пр для в/б терапии опухолевых поражений брюшной полости человека, для которого ГГ/ЦП выступает в качестве адъюванта.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Wang Y., Gong Ch., Yang L. et al. 5-FU-hydrogel inhibits colorectal peritoneal carcinomatosis and tumor growth in mice. *BMC Cancer* 2010;10(8):402. DOI: 10.1186/1471-2407-10-402. PMID: 20678220.
2. Ревтович М.Ю., Истомин Ю.П., Красько О.В. и др. Противоопухолевая активность гидрогелевой формы цисплатина на асцитной гепатоме Зайделя. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(4):96–101. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-97-102.
3. Soma D., Kitayama J., Konno T. et al. Intraperitoneal administration of Paclitaxel solubilized with poly-2-methacryloxyethyl-phosphorylcholine-co-n-butylmethacrylate for peritoneal dissemination of gastric cancer. *Cancer Sci* 2009;100(10):1979–85. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01265.x. PMID: 19604244.
4. Konishi M., Tabata Y., Kariya M. et al. In vivo anti-tumor effect through the controlled release of cisplatin from biodegradable gelatin hydrogel. *J Control Release* 2003;92(3):301–13. PMID: 14568411.
5. Hyoudou K., Nishikawa M., Ikemura M. et al. Cationized catalase-loaded hydrogel for growth inhibition of peritoneally disseminated tumor cells. *J Control Release* 2007;122(2):151–8. PMID: 17651858.
6. Van Tomme S.R., Hennink W.E. Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications. *Expert Rev Med Devices* 2007;4(2):147–64. DOI: 10.1586/17434440.4.2.147. PMID: 17359222.
7. Ревтович М.Ю., Бычковский П.М., Красько О.В. и др. Интраперитонеальная химиотерапия полимер-иммобилизованной формой проспидина асцитной гепатомы Зайделя. *Вестник БГУ (серия 2)* 2015;2:29–37.
8. Бычковский П.М., Юркштович Т.Л., Голуб Н.В. и др. Получение и противоопухолевая активность гелеобразующего препарата проспидина. *Химико-фармацевтический журнал* 2013;47(4):107–12.
9. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–657.
10. Bate S.T., Clark R.A. The design and statistical analysis of animal experiments. Cambridge: University Press, 2014. Pp. 234–237.
11. Festing M.F.W., Altman D.G. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J* 2002;43(4):244–58. DOI: 10.1093/ilar.43.4.244. PMID: 12391400.
12. Therneau T., Grambsch P. Modeling survival data: extending the Cox model. New York: Springer-Verlag, 2000. 350 p.
13. R Core Team (2014). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/> (last access date 01.11.2014).