

**Статистика множественных сравнений в  
ассоциативных исследованиях полиморфизма  
ДНК:**

# **Кошмар Бонферрони**

**Рубанович А.В.**

*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН*

# **Опыты по выявлению людей с паранормальными способностями: Joseph Rhine (1950)**

**Вывод Д. Райна:**

**«нельзя сообщать подопытным людям  
об их паранормальных способностях»**

**12 человек угадали 9 из 10 карт, двое все 10 карт**

**Все выявленные «экстрасенсы» в последующих опытах не  
подтвердили свои способности**

## Что произошло?

Вероятность угадать все 10 карт =  $\left(\frac{1}{2}\right)^{10} \approx 0.00098$

Вероятность угадать 9 карт =  $10\left(\frac{1}{2}\right)^{10} \approx 0.0098$

Вероятность угадать 9 или все 10 карт =  $11\left(\frac{1}{2}\right)^{10}$

1 - P(100 раз не найти)

Шансы найти «экстрасенса»

среди 100 человек =  $1 - (1 - 0.0107)^{100} \approx 0.66$

Шансы найти «экстрасенса»

среди 1000 человек =  $1 - (1 - 0.0107)^{1000} \approx 0.9998$

# Точный тест Фишера с помощью монеты

Контроль:  
1 дицентрик на 1000 клеток

против

Облучение:  
9 дицентриков на 1000 клеток

Эти различия значимы  
(в единичном тесте),

Control:  
1 мутация на 100 здоровых

против

Case:  
9 мутаций на 100 больных

...и не зависит от самих объемов выборок!!!

.0107

в 10 бросаниях монеты

но при проведении 100 тестов  
вероятность появления  
фальшивых отличий равна

$$p = 1 - (1 - 0.0107)^{100} \approx 0.66$$

# Почему в середине 90-ых заговорили о проблеме «multiple comparisons» ?

- В ассоциативных исследованиях полиморфизма ДНК, как правило, фигурируют 3-5 (или 5-20) полиморфных локусов (это число еще нужно умножить на число

Проведение большого количества тестов  
(множественных сравнений)  
связано с опасностью фальшивых открытий

- Мета-исследования (исследования исследований): как объединять и сравнивать данные, полученные разными авторами

# Генерируем две одноклассовые выборки

## Наблюдаем свойства

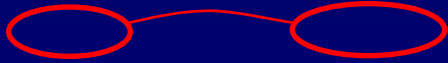
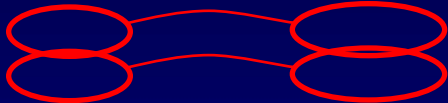
**Odd Ratio** – отношение шансов, популярная мера сопряженности. При отсутствии связи  $OR=1$

Должно быть  $OR=1$

Частоты минорных аллелей (в среднем 0.1)

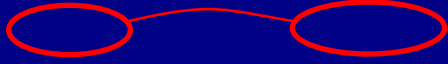
Ген	Больные	Здоровые	OR	p
1	7	8		
2	10	2		
3	17	5		
4	13	12		
5	12	11		
6	7	10		
7	10	12		
8	14	9		
9	14	8		
10	9	12		
11	13	9		
12	9	14		
13	10	13		
14	8	8		
15	14	12		
16	17	7		
17	11	13		
18	10	8		
19	16	10		
20	12	8		

4



Значим

Сразу 3 локуса «ассоциированы» с заболеваемостью!



# Как же избежать фальшивых открытий?

При проведении  $m$  независимых статистических тестов на уровне значимости  $\alpha$ , вероятность хотя бы одного фальшивого результата должна быть

$$1 - (1 - \alpha)^m < 0.05$$



$$\alpha = 1 - (1 - 0.05)^{1/m} \approx \frac{0.05}{m}$$

## Правило Карло Бонферрони (1935):

При проведение  $m$  независимых статистических тестов значимы только те результаты, для которых

$$p < \frac{0.05}{m}$$

# Правило Бонферрони ликвидирует значимость вполне определенных результатов:

Две мутации, ассоциированные с заболеванием

	Контроль (100)	Больные (100)	OR	p
Мутация 1	1	7	7,45	0,0349
Мутация 2	5	15	3,6	0,0253

Однако правило Бонферрони требует:  
 $p < 0,05/2=0,025$

1 против 7 при равных по объему выборках:

$$p = \binom{1}{2}^8 + 8 \binom{1}{2}^8 = 9 \binom{1}{2}^8 = \frac{9}{256} \approx 0.035$$



# Правило Бонферрони ликвидирует значимость вполне определенных результатов:

Одна мутация + любой, не относящийся к делу признак

	Контроль (100)	Больные (100)	OR	p
Мутация 1	1	7	7,45	0,0349
Фамилия начинается с гласной буквы	36	40	1,19	0,646

Правило Бонферрони требует:  
 $p < 0,05/2=0,025$

Увы, это не  
шутка!!!

# Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population

F. Marcona, C. Andreoli, et al. Mut. Res., 541 (2003)

Table 1

Analysis of chromosome radiosensitivity by selected variables in 31 healthy subjects

Variable				P-value <sup>b</sup>
All				
Age (years) <sup>c</sup>				
<40				
40-44				
>44				0.990
Gender				
Male				
Female				0.953
Smoking habits <sup>d</sup>				
NS	19	1.9 ± 1.6	32.7 ± 8.8	
LS	6	1.6 ± 0.7	32.0 ± 8.9	
HS	6	1.7 ± 1.5	24.3 ± 6.8	0.050
Occupational exposure <sup>e</sup>				
Unexposed	17	1.8 ± 1.2	29.6 ± 9.6	
Exposed		1.8 ± 1.7	32.6 ± 7.9	0.246
Genotype				
GSTM1-positive	20	1.7 ± 1.3	33.4 ± 9.3	
GSTM1-null	11	2.0 ± 1.5	26.4 ± 6.0	0.025
GSTT1-positive	25	2.0 ± 1.4	32.2 ± 9.0	
GSTT1-null	6	0.9 ± 0.9	25.7 ± 6.8	0.174
NQO1-positive	19	1.8 ± 1.6	31.0 ± 7.8	
NQO1 mut	11	1.8 ± 1.0	29.3 ± 9.7	
NQO1 double mut	1	1.0	48.0	0.251

Незначимо!  
 Поправка Бонферрони требует:  

$$p < \frac{0,05}{3} \approx 0.0167$$

ГЕНОТИПЫ

# High-Throughput Detection of GST Polymorphic Alleles in a Pediatric Cancer Population

P. Barnette, R. Scholl, et al. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* Vol. 13, 304–313, 2004

Контроль

13 генотипов

8 видов заболеваний

OR=6,4  
P=0,007

Гомозиготность по делециям GST защищает от рака!

OR=2,3  
P=0,018

Незначимо!  
Поправка Бонферрони требует:

$$p < \frac{0,05}{13 \cdot 8} \approx 0.0005$$

	All patients		ALL		Ewing's Sarcoma		Glial brain tumors		Medullo-blastoma		Neuro-blastoma		Osteo-sarcoma		Retino-blastoma		Rhabdo-myosarcoma		
	(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	%	
<b>GSTM1 genotypes</b>																			
<b>GSTM1*0/0</b>	183	56	48	51	6	46	8	47	8	57	3	30	2	17					64
GSTM1*A/unknown	131	40	30	32	4	31	8	47	3	21	3	30	5	42					18
GSTM1*A/B	2	0	2	2	2	15	0	0	0	0	1	10	0	0	0	0	0	0	0
GSTM1*B/unknown	14	4	14	15	1	8	1	6	2	21	2	20	5	42	2	25	2	14	18
<b>Total</b>	300	100	164	100	12	100	13	100	9	100	9	100	12	100	7	100	14	100	100
<b>GSTT1 genotypes</b>																			
<b>GSTT1*0/0</b>	66	22	24	15	9	11	7	3	25	4	44	2	17	0	0	0	2	14	14
GSTT1*/unknown	234	78	141	85	72	89	93	9	75	5	56	10	83	7	100	12	86	86	86
<b>Total</b>	300	100	165	100	81	100	12	100	15	100	9	100	12	100	7	100	14	100	100
<b>GSTP1 genotypes</b>																			
GSTP1*A/A	122	42											42	3	38	5	31	31	31
GSTP1*A/B	102	35											33	3	38	6	38	38	38
GSTP1*A/C	30	10											0	1	12	3	19	19	19
GSTP1*A/D	0	0											0	0	0	0	0	0	0
GSTP1*B/B	22	8											25	1	12	0	0	0	0
GSTP1*B/C	11	4											0	0	0	2	13	13	13
GSTP1*C/C	1	0											0	0	0	0	0	0	0
GSTP1*C/D	0	0											0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	288	100											100	8	100	16	101	101	101
<b>GSTP1 allele frequencies</b>																			
GSTP1*A	376	65											58	10	63	19	59	59	59
GSTP1*B	157	27											42	5	31	8	25	25	25
GSTP1*C	43	7.5	31	9	11	7	0	0	4	15	3	15	1	6	0	0	16	16	16
GSTP1*D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	576	100	340	100	166	100	24	100	32	100	20	100	18	100	24	100	32	100	100

# Implication of Xenobiotic Metabolizing Enzyme gene (CYP2E1, CYP2C19, CYP2D6, mEH and NAT2) Polymorphisms in Breast Carcinoma

A. Khedhaier, E. Hassen, et. al. *BMC Cancer*, 2008

Genotypes	Controls		All Patients		P	OR (95%CI)
	n	f	n	f		
<b>CYP2E1</b> (C-1091T)	244		304			
CYP2E1 (C/C)	232	0.95	296	0.97	N.S	1.91(0.72–5.22)
CYP2E1 (C/T)	12	0.05	08	0.03	N.S	0.52(0.19–1.4)
CYP2E1 (T/T)	00	0.00	00	0.00	N.S	-
<b>CYP2C19</b> (exon5 G-A)	240		304			
CYP2C19 (G/G)	197	0.822	239	0.787	N.S	0.8(0.51–1.26)
CYP2C19 (A/G)	41	0.170	61	0.200	N.S	1.23(0.77–1.97)
CYP2C19 (A/A)	02	0.008	04	0.013	N.S	1.5(0.37–6.1)
<b>CYP2D6</b> (G1934A)						
CYP2D6 (G/G)	239	0.979	297	0.977	N.S	1.0(0.51–1.9)
CYP2D6 (G/A)	56	0.243	58	0.191	N.S	0.77(0.41–1.4)
CYP2D6 (A/A)	07	0.031	07	0.023	N.S	0.73(0.26–2.0)
<b>mEH</b> (T348C)	244		306			
mEH1 (Tyr/Tyr)	113	0.463	149	0.486	N.S	1.1(0.77–1.56)
mEH2 (Tyr/His)	115	0.471	119	0.388	N.S	0.71(0.5–1.02)
<b>mEH3 (His/His)</b>	16	<b>0.065</b>	38	<b>0.124</b>	<b>0.02</b>	<b>2.02(1.06–3.89)</b>
<b>NAT2</b>	237		290			
Rapid Acetylators	14	0.059	24	0.082	N.S	1.44(0.69–3)
Intermediate Acetylators	105	0.443	92	0.317	N.S	0.58(0.4–0.85)
Slow Acetylators	118	0.497	174	0.600	<b>0.01</b>	<b>1.51(1.05–2.17)</b>

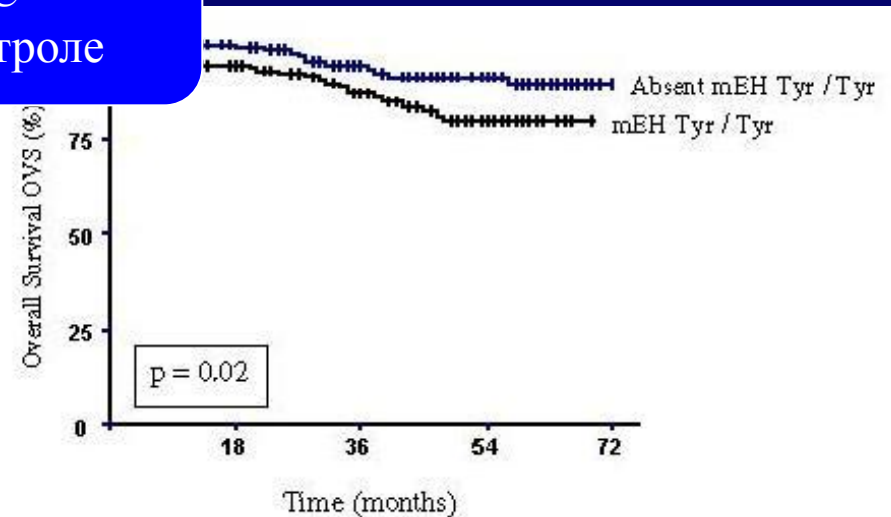
microsomal Epoxide Hydrolase  
Минорный аллель (C)  
обуславливает  
активную

У больных  
гомозигот CC  
против 6% в контроле

Все стройно,  
но Бонферрони требует:

$$p < 0,05 \approx 0.004$$

При этом среднее время выживания гомозигот CC выше, чем у больных с другими генотипами (повышенная эффективность химиотерапии?)



# Bonferroni method creates more problems than it solves

Аргументы Томаса Пернежера (Thomas Perneger, 1998):

- ❑ Интерпретация данных зависит от числа тестов. Это противно нашей интуиции. Данные не могут терять значимость от того, что их кто-то подтвердил!
- ❑ При большом количестве тестов гипотеза о том, что все наблюдаемые различия неслучайны, никому не нужна
- ❑ При коррекции Бонферрони вероятность упустить существенные различия столь велика, что
- ❑ ...лучше просто перечислить какие тесты дали значимые результаты и, главное, почему



“Bonferroni adjustments are, at best, unnecessary and, at worst, deleterious to sound statistical inference...”

# Из разговоров на форуме [molbiol.ru](http://molbiol.ru):

- ...мы не будем гробить свои результаты из-за какого-то там Бонферрони
- ...спрашивать диссертанта о Бонферрони – это дурной тон
- ...«бонферронофобия» набирает обороты
- ...разработчики программ не желают вводить кнопочку «Bonferroni»
- ...хуже Бонферрони ничего нет, не считая отсутствия всякой коррекции

# Чуть-чуть об ошибках статистических тестов

Нулевая  
различия

Традиционно биолог ориентирован на контроль  
ошибки I рода (через уровень значимости),  
т.е. на гарантии отсутствия ложных открытий,

и  
ости

## Ошибка I рода ( $\alpha$ )

Вероятность отвергнуть правильную нулевую гипотезу =  
Вероятность обнаружить различия там, где их нет = **Вероятность совершить фальшивое открытие**



## Ошибка II рода ( $\beta$ )

Вероятность принять неправильную нулевую гипотезу =  
Вероятность не обнаружить существующие различия =  
**Вероятность упустить открытие**



Мощно  
Вероятн  
Вероятн

... и при этом мало заботится о возможности  
упустить открытие (ошибка II рода)

# Мощность статистических тестов

- ❑ Мощность 80% считается приемлемой  
(мощность обычных тестов в реальных ситуациях)
- ❑ Консервативный тест - это тест с низкой мощностью  
(напр., критерий Колмогорова-Смирнова)
- ❑ **Метод Бонферрони – архиконсервативен**  
(особенно при сравнении частот)
- ❑ Во многих случаях коррекция Бонферрони делает выявление значимых результатов попросту невозможным



# От чего зависят ошибки статистических тестов?

❑ От размаха реально существующих отличий и разброса данных

❑ От объемов выборок

Ошибка I рода (вероятность фальшивого открытия)

слабо зависит от объемов выборок,  
если они сравнимы по величине

(главная причина маломощности метода Бонферрони )

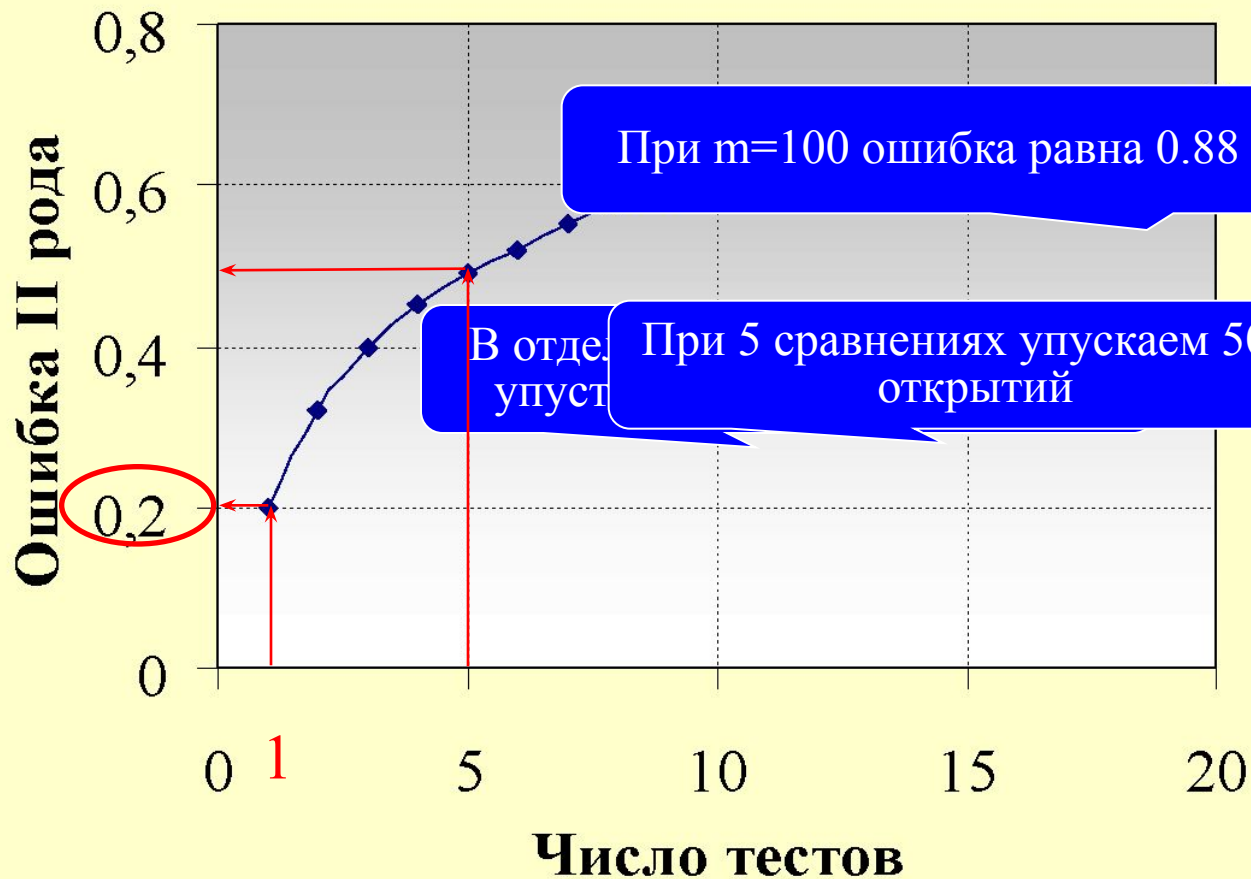
Крайний случай:

«критерий» св. Фомы Неверующего (0033)

Ошибка I рода = 0  $\Leftrightarrow$  Ошибка II рода = 1

# Зависимость ошибки II рода от числа тестов при

При 100 сравнениях ради того, чтобы гарантировать отсутствие хотя бы одного ложного результата, мы упускаем 88% открытий!



# Новый принцип проверки статистических гипотез: FDR-контроль

False Discovery Rate control: Benjamini, Hochberg (1995)

Вероятность фальшивого открытия < Уровня значимости  
Ошибка I рода < 0.05

Традиционный принцип  
заменяется на



105 статей в



Средняя доля фальшивых открытий < Выбранный уровень

$$E\left(\frac{\text{Число неправильно отвергнутых нулевых гипотез}}{\text{Число отвергнутых нулевых гипотез}}\right) < 0.05$$

# Алгоритм контроля FDR

(Benjamini, Hochberg, 1995)

- Упорядочиваем тесты по уровню  $p$ -величин:

$$p_1 \leq p_2 \leq \dots \leq p_m.$$

- Для контроля FDR на уровне  $\alpha$  находим

Величина  $p$  для  $j$ -ого теста (гена)

Порядковый номер

Желательный уровень значимости

$$j^* = \max \left\{ j : p_j \leq \frac{j}{m} \alpha \right\}$$

- Считаем различия значимыми при  $j \leq j^*$

Общее число тестов (генов)

- При  $j > j^*$  различия считаются незначимыми

# Пример: множественные сравнения по 10 тестам

Тест	$p_i$	Корр Bonf	
1	0,001	0,005	0,005
2	0,0055	0,005	0,010
3			0,015
4			0,020
5			0,025
6			0,030
7	0,3		
8			
9			
10	0,8	0,005	0,050

Располагаем тесты в порядке увеличения  $p_i$

Значимые различия после коррекции по FDR

В первой клетке —  
во второй клетке —  
втрое больше  
и т.д. ....

Поправка Бонферрони  
оставляет значимым лишь  
первое сравнение

И это все!!!

Для 6-ого  
ЭТОГО значения

НОСТЬ

# То же самое в общем случае:

$m$  – число сравнений,  $\alpha = 0.05$  (например)

	Bonferroni (1939)	FDR (1995)
$p_1 <$	$\alpha/m$	$\alpha/m$

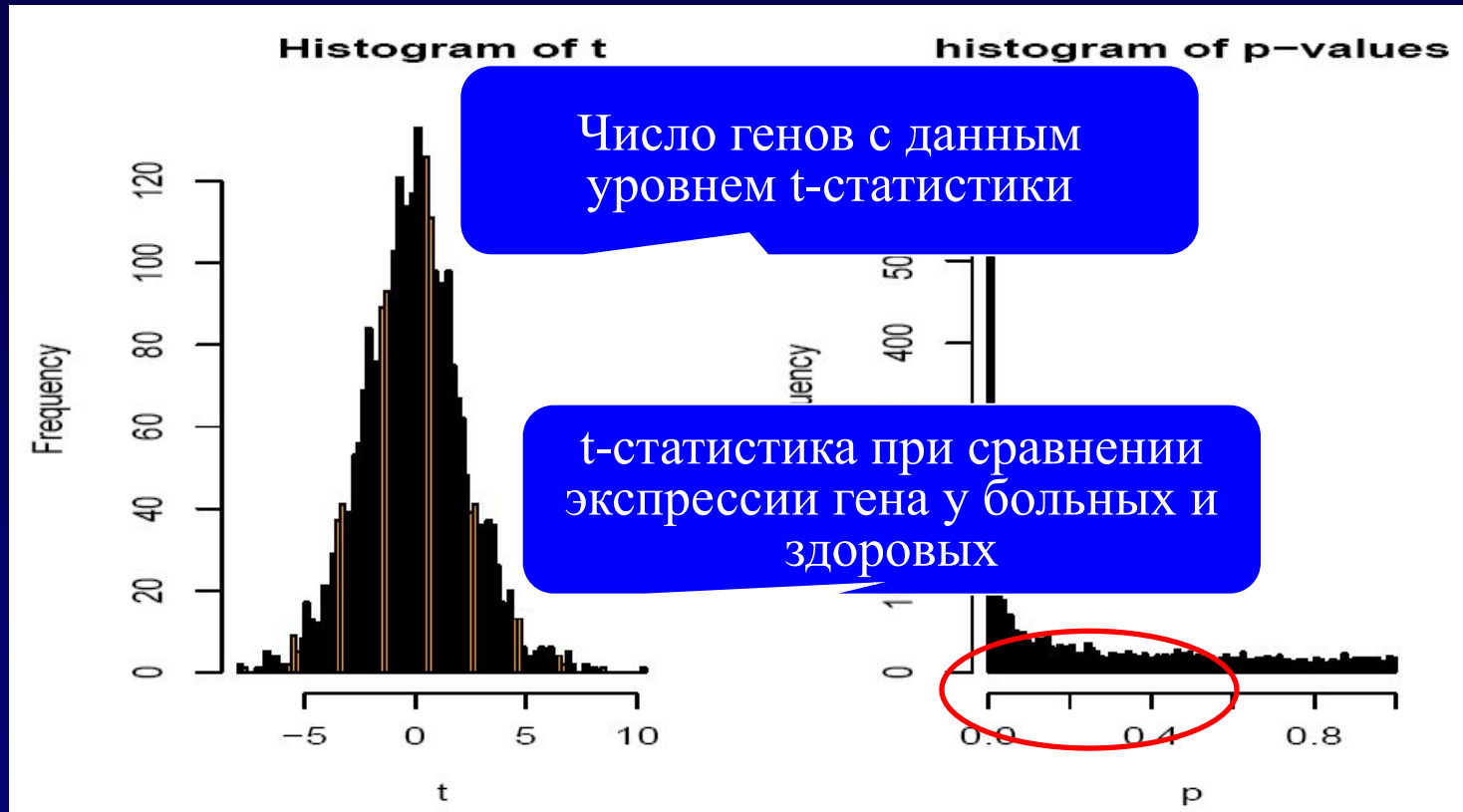
**Бонферрони торжествует!**

Контроль FDR приносит ощутимые результаты,  
если хотя бы один тест удовлетворяет  
правилу  $p < \alpha/m$

$p_i$	$\alpha/m$	$\alpha/m$
...	$\alpha/m$	...
$p_m$	$\alpha/m$	$\alpha$

# Пример: экспрессия 3051 генов при острой лейкемии

Golub T.R. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. // Science. 2001, v.286.



- t-тест: 1045 генов, для которых  $p < 0.05$
- Коррекция Бонферрони : 98 генов для  $p' < 0.000016$
- FDR: 681 генов, для которых  $FDR < 0.05$

# Что делать, если FDR не помогает?

## Permutation tests:

случайные перестановки пометок «case-control»  
в компьютерных симуляциях по алгоритму:

- В исходной базе данных делаем случайную перестановку лейблов case-control

Точный тест Фишера – это тоже permutation test,  
только реализованный аналитически ( $p$   
вычисляется  
по формулам комбинаторной теории вероятностей)

- Вычисляем откорректированное  $p$  как

$$p' = \frac{\text{Число случаев } (p_{perm} \leq p)}{N}$$



# Permutation test применительно к данным об ассоциации заболеваемости с 10 SNP

Переставляем отметки «case-control» 10000 раз. В результате получаем коррекцию  $p$

SNP	Частота минорного аллеля		OR	p-value	
	Case (100)	Control (100)		Бонферрони	FDR
1	62	26	4,6	0,0001	0,000
2	31	17	3,7	0,009	0,010
3	21	11	2,8	0,011	0,007
4	20	8	2,9	0,023	0,025
5	19	11	3,0	0,071	0,109
6	18	12	2,0	0,096	0,098
7	44	30	1,8	0,103	0,058
8	54	39	1,8	0,120	0,067
9	59	53	1,3	0,571	0,476
10	40	41	1,0	0,911	1,000

Но так бывает не всегда

Значимо по Бонферрони

Значимо по FDR  
коррекция на множественность

# Почему Permutation test так либерален?

- ❑ Поправки Бонферрони и FDR предполагают, что все тесты независимы
- ❑ Перестановка лейблов «case-control» сохраняет корреляционные связи между данными (в случае полиморфных генов можно сказать: «учитывает неравновесие по сцеплению»)
- ❑ Учитывает совместные распределения тестовых статистик
- ❑ В результате **Permutation test** значительно менее консервативен, чем **Bonferroni** и **FDR**



# Как реализовать permutation tests?

Не предусмотрен в стандартных статпакетах.

На сегодняшний день доступно:

- ❑ **SNPAlyze™** free 30 days trial  
<https://www.dynacom.co.jp/en/>

- ❑ **PowerMarker**  
<http://statgen.ncsu.edu/powermarker/>

- ❑  Free software environment for statistical computing and graphics with **встроенные функции**  
<http://www.r-project.org/index.html>

И все же всегда проще самому!

```
simNum = 10000;
suDif = Table[0, {Length@base}];
Do[RandomPermutation[volSample];
  tot = Join[one.health];
  ill = tot[[base[[1, volSample]]]];
  health = tot[[base[[1, volSample]]]];
  genCase1 = one.ill;
  genControl = one.health;
  xiSq = genCase1[[genControl[[1, 2]]]] - genCase1[[genControl[[1, 1]]]];
  p1 = 1 - CDF[ChiSquareDistribution[4], xiSq];
  suDif = suDif + UnitStep[p1];
simp = suDif/simNum;
```



# Борьба с кошмаром Бонферрони продолжается!

- Нейронные сети, случайные деревья, генетические алгоритмы, гибсовские поля и еще Бог знает что
- Типичная ситуация для 3 локусов: 27 возможных генотипов, но лишь 5-7 гаплотипов встречаются с частотой  $>1\%$  **аняется!**
- Если число локусов  $\geq 3$ , то обычно число наблюдаемых гаплотипов  $\ll$  числа генотипов

# Soft для работы с гаплотипами



<http://www.bios.unc.edu/~lin/hapstat/>  
**hapstat**  
statistical analysis of haplotype-disease association



**SNPStats: Your web tool for SNP analysis.**

X. Sole, E. Guino, J. Valls, R. Iniesta<sup>1</sup>, V. Moreno (2006)

<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>

## Однолокусный анализ

- Allele and genotype frequencies
- Test for Hardy-Weinberg equilibrium
- Analysis of association with a response variable based on linear or logistic regression
- Multiple inheritance models: co-dominant, dominant, recessive, over-dominant and additive
- Analysis of interactions (gene-gene or gene-environment)

## Многолокусный анализ

- Linkage disequilibrium statistics
- Haplotype frequency estimation
- Analysis of association of haplotypes with the response
- Analysis of interactions (haplotypes-covariate)

Index

Descriptive statistics

Single-SNP analysis

snp1

snp2

Multiple-SNP analysis

Linkage disequilibrium analysis  
Haplotype analysis

Descriptive statistics

Response variable: group Type: ca

n	missing	uni
212	0	2

	group=C	group=Co	OR (95% CI)
A/G Female	38	48	1.00
Male	53	43	0.64 (0.36-1.15)

	group=C	group=Co	OR (95% CI)
A/G Female	6	4	1.00
Male	5	6	1.80 (0.32-10.1)

Percentage of typed samples: 205/212 (96.7%)

Haplotype association with response (n=164, crude analysis)

	<i>COMT</i>	<i>GSTP1</i>	<i>MTHFR</i>	<i>Freq</i>	<i>OR (95% CI)</i>	<i>P-value</i>
1	L	A	C	0.2719	1	---
2	H	A	C	0.1996	2.69 (1.02 - 7.12)	0.048
3	L	G	T	0.076		0.076
4	L	A	T	0.062		0.062
5	H	A	T	0.099	2.08 (0.77 - 5.60)	0.15
6	L	G	T	0.0906	1.50 (0.49 - 4.62)	0.48
7	L	A	T	0.0773	3.24 (0.67 - 15.68)	0.15
8	H	G	T	0.0402	13.88 (1.21 - 158.65)	0.036

По отдельности локусы не обнаруживают значимых ассоциаций!

Global haplotype association p-value: **0.033**

# Почему не следует пренебрегать коррекцией на множественность сравнений?

- ❑ Чтобы не уподобиться старому Джозефу
- ❑ Чтобы преодолеть соблазн раздувать отчет о проделанной работе
- ❑ Чтобы предупредить выпадения недоброжелателей
- ❑ Это просто и делается вручную.

Если хотя бы одно сравнение проходит через сито Бонферрони, то с Вас хватит **FDR**. В противном случае Вам не обойтись без перестановочного компьютерного теста.





**Спасибо**  
**Оргкомитету школы**  
**и Всем присутствующим !!!**

*С удовольствием предоставляю копию презентации  
заинтересованными коллегам*

**rubanovich@vigg.ru**

# Bonferroni, FWER, FDR и все такое

- Bonferroni контролирует **FWER** (**f**amily-**w**ise **e**rror **r**ate), т.е., вероятность хотя бы одного фальшивого открытия ассоциации гена с заболеваемостью
- **FDR** – это контроль средней доли фальш-ассоциированных генов среди всех генов, для которых отвергнута нулевая гипотеза.

Association between Common Variation in 120 Candidate Genes and Breast Cancer Risk  
P. Pharoah, J. Tyrer<sup>1</sup> et al. PLoS Genetics, 2007.

710 SNP (120 genes), Case - 4400, Control – 4400.

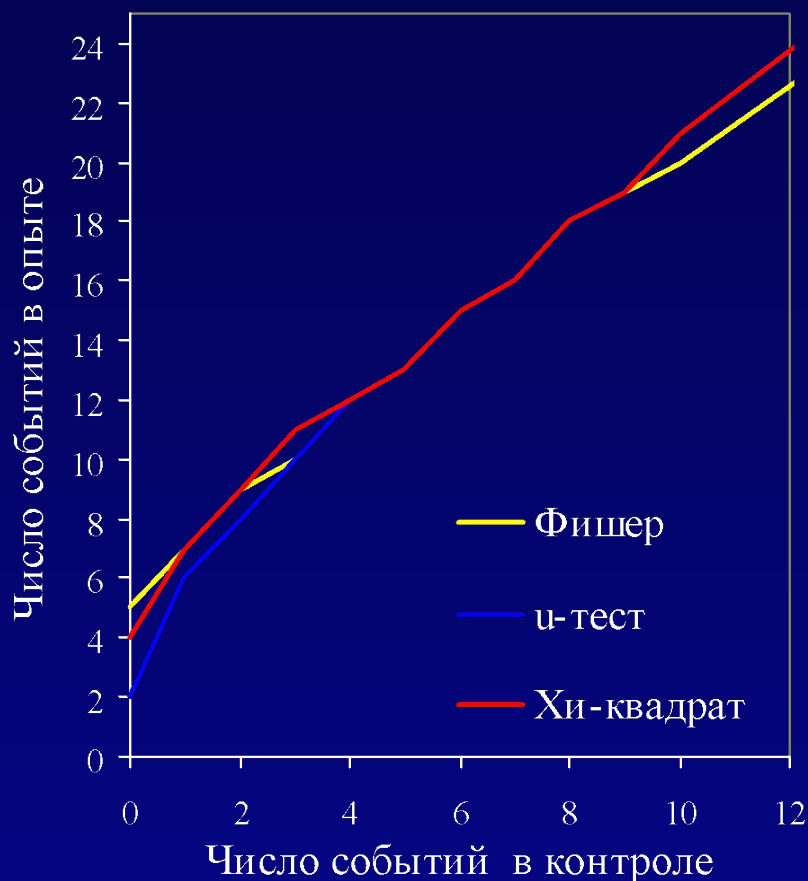
Слабые ассоциации:

- 104 SNP в 8 генах метаболизма стероидных гормонов
- 112 SNP в 18 генах контроля клеточного цикла

- Изменчивость признаков не определяется редкими мутациями отдельных генов, но зависит от большого числа SNP (со слабыми индивидуальными эффектами)
- Ассоциативные исследования полиморфизма ДНК с необходимостью должны быть многолокусными

# Сравнение частот при уровне значимости 0.05

Объемы выборок в опыте и контроле одинаковы



Число событий в контроле	Минимальное число событий в опыте при значимом отличии от контроля		
	u-тест	$\chi^2$	Фишер
0	2	4	5
1	6	7	7
2	8	9	9

больше 5 независимо от того, сколько клеток Вы просчитали – 100 или 1000

6	15	15	15
7	16	16	16
8	18	18	18
9	19	19	19
10	21	21	20
20	35	35	33
30	47	47	46