

Н. А. Бизунок

ИНТЕРАКТИВНЫЙ АЛГОРИТМ АНАЛИЗА КОМБИНИРОВАННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ ПО CHOU-TALALAY: ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ ОСНОВА И ОПЫТ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Одним из наиболее обоснованных подходов к оценке фармакодинамических взаимодействий лекарственных средств (биологически активных веществ или физических факторов) является практическое приложение детально разработанной и широко апробированной «универсальной» теории Chou-Talalay и её теоремы комбинаторного индекса. Разработанный на кафедре фармакологии УО БГМУ алгоритм изучения и анализа комбинированных воздействий по Chou-Talalay позволяет быстро рассчитать направленность и силу фармакодинамических взаимодействий по значению комбинаторного индекса (CI), а также установить индекс снижения дозы (DRI) для каждого компонента комбинации. Алгоритм позволяет анализировать комбинации различного качественного и количественного состава, рассчитывать результат взаимодействия на любом уровне фармакологического (токсического) эффекта при любой желаемой вероятности безошибочного прогноза. Алгоритм может быть использован в научных лабораториях, занимающихся разработкой и изучением лекарственных средств, а также проблемами комбинированного воздействия ксенобиотиков (физических факторов) на биологические системы любого уровня организации.

Ключевые слова: алгоритм, индекс снижения дозы, комбинаторный индекс, теория Chou-Talalay, фармакологический эффект, фармакодинамические взаимодействия, синергизм.

N. A. Bizunok

INTERACTIVE ALGORITHM FOR COMBINED EFFECTS ANALYSIS BY CHOU-TALALAY: FUNDAMENTALS AND PRACTICAL EXPERIENCE

One of the most reasonable approach to the assessment of pharmacodynamic interactions of drugs (active substances or physical factors) is a practical application of an elaborate and well proven «universal» theory of Chou-Talalay and its theorems of combinatorial index and the index of dose reduction. Developed by the Department of Pharmacology (BSMU) algorithm study and analysis of the combined effects of Chou-Talalay allows you to quickly calculate the direction and force of pharmacodynamic interactions meaningfully combinatorial index (CI), and establish dose reduction index (DRI) for each component of the combination. The algorithm allows you to analyze various combinations of qualitative and quantitative composition, count the result of interaction at every level of pharmacological (toxic) effect in any desired probability of faultless prognosis. The developed product can be used in research laboratories engaged in the development and study of the drug as well as the problems of the combined effects of xenobiotics (or physical agents) on biological systems at all levels of the organization.

Key words: algorithm, dose reduction index, combinatorial index, theory of Chou-Talalay, pharmacological effect, pharmacodynamic interactions, synergies.

Комбинированные воздействия на организм человека составляют основу лечебных технологий в современной медицине, к таким технологиям в частности относятся комбинированная фармакотерапия, комбинированная физиотерапия, комбинированная радиотерапия, а также комбинированное применение лекарственных средств и физических (физиотерапевтических) методов лечения. Кроме того, комбинированные воздействия химических веществ и физических факторов интенсивно изучаются в промышленной и военной

токсикологии. Корректная оценка комбинированных воздействий на биообъекты разного уровня организации представляет практический интерес для исследователей любого профиля. Основной целью такого анализа является установление направленности и силы взаимодействия компонентов комбинации с позиций оценки их синергизма или антагонизма. Несмотря на многолетние исследования комбинированных воздействий [2–6], количество методов, позволяющих надежно установить результат взаимодействия компонентов ком-

бинаций, чрезвычайно ограничено. Одним из них является подход, изложенный в настоящей работе, который основан на практическом приложении теоремы комбинаторного индекса, разработанной американскими исследователями Т. Chou и Р. Talalay в 1980-х годах [2, 3]. Этот подход апробирован более чем 30-и летним опытом практического применения и в настоящее время успешно используются крупнейшими мировыми разработчиками при создании инновационных лечебных технологий и оценке рисков комбинированных поражений. К сожалению, этот опыт практически не известен в Республике Беларусь и других постсоветских странах.

Целью настоящей работы является информирование широкого круга читателей о сущности «универсальной» теории Chou-Talalay и теоремы комбинаторного индекса, а также обмен опытом их практического приложения в экспериментальных исследованиях.

Материалы и методы

На основе фундаментальных предпосылок «универсальной» теории Chou-Talalay и теоремы комбинаторного индекса на кафедре фармакологии УО БГМУ был разработан и внедрен интерактивный алгоритм анализа комбинированного воздействия химических веществ (ксенобиотиков) и физических факторов в эксперименте [1]. Использование настоящего интерактивного алгоритма требует минимального программного обеспечения, а также навыков практической работы в программах MS Excel 2000 и Statistica 6,0 (или более поздних версиях). Алгоритм приложим к анализу результатов, полученных на моделях любого уровня организации – от клеточных культур до целостного организма и имеет чрезвычайно широкие возможности практического приложения, позволяя оценивать результат комбинированного воздействия, как при разработке новых лечебных технологий, так и при оценке токсических рисков в промышленной гигиене и военной медицине.

Результаты и обсуждение

Фундаментальные основы. Среди физико-химических законов, управляющих работой биологических систем, особое место занимают закон действующих масс (С. М. Guldberg и Р. Waage, 1864), закон равновесия (А. Ф. Horstmann, J. W. Gibbs, и J. H. Van't Hoff, 1873–1886) и теория абсолютной скорости реакции (М. Polanyi and Н. Eyring, 1935). Они являются фундаментальной основой анализа кинетики ферментативных реакций и рецепторной теории, которые, в свою очередь, создают базис

для приложения математических методов анализа к решению физико-химических проблем.

На основе систематического анализа классической кинетики ферментативных реакций и моделей рецепторных взаимодействий американскими учеными Т. Chou и Р. Talalay было предложено уравнение медианного эффекта [2], которое описывает зависимость «доза – эффект» и имеет вид:

$$f_a/f_u = (D/D_m)^m, \quad (1)$$

где D – доза или концентрация вещества/доза физического фактора; f_a – фракция «затронутая» (на которую повлияли) данной дозой или концентрацией вещества/дозой физического фактора (например, % погибших клеток); f_u – «незатронутая» фракция (на которую повлиять не удалось) данной дозой или концентрацией вещества/дозой физического фактора ($f_u = 1 - f_a$); D_m – средняя эффективная доза (например, IC_{50} , ED_{50} или LD_{50}); m – коэффициент, выражающий форму кривой «доза – эффект» ($m = 1, > 1$, и < 1 указывает на гиперболическую, сигмоидную или флэт-сигмоидную кривую, соответственно)

Уравнение базируется на универсальном законе действующих масс и показывает, что доза и эффект являются равнозначными и взаимозависимыми переменными. Оно является наиболее простой из возможных форм выражения связи «доза – эффект». На основании уравнения медианного эффекта, доза (D) для любого эффекта (f_a) может быть определена, если значения D_m и m известны, подобно тому, как эффект (f_a) для любой дозы (D) также может быть установлен, если известны значения D_m и m .

$$D = D_m [f_a / (1 - f_a)]^{1/m} \quad (2)$$

$$f_a = 1 / [1 + (D_m / D)^m] \quad (3)$$

Кривую зависимости доза-эффект (гиперболическую или сигмоидную) на основании уравнения медианного эффекта можно изобразить в виде прямой, которую называют графиком медианного эффекта (*the median-effect plot*), где $x = \log(D)$, а $y = \log(f_a/f_u)$, при помощи уравнения:

$$\log(f_a/f_u) = m \cdot \log D - m \cdot \log D_m \quad (4)$$

Данное уравнение соответствует классическому уравнению линейной регрессии:

$$y = mx + y_{int} \quad (5)$$

m – коэффициент наклона, y_{int} – коэффициент сдвига (значение y в точке $x = 0$).

При этом зависимость эффекта от дозы (сила связи между двумя переменными) характеризуется коэффициентом корреляции (r).

Тогда значение D_m может быть рассчитано следующим образом:

$$D_m = 10^{-(y_{int}/m)} \quad (6)$$

Использование уравнения медианного эффекта для анализа зависимости «доза – эффект» позволяет получить прямую уже по данным двух экспериментальных наблюдений, тогда как это практически невозможно сделать при помощи обычных статистических методов. Многие эмпирические уравнения, полученные в биомедицинских исследованиях, такие как закон силы, логит-закон или пробит-закон, помогают представить кривую «доза – эффект» в виде прямой, но их параметры и коэффициенты не имеют физико-химического обоснования.

Уравнение медианного эффекта для одного вещества или физического фактора можно экстраполировать на несколько веществ или факторов. Для комбинации состоящих из двух компонентов оно имеет вид:

$$\left[\frac{(f_a)_{1,2}}{(f_u)_{1,2}} \right]^{1/m} = \left[\frac{(f_a)_1}{(f_u)_1} \right]^{1/m} + \left[\frac{(f_a)_2}{(f_u)_2} \right]^{1/m} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2} \quad (7)$$

На основании этого уравнения для количественного выражения фармакодинамического взаимодействия (синергизма или антагонизма) биологически активных веществ (или физических факторов) рассчитывается «комбинаторный индекс» (*combination index* (CI)):

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} \quad (8)$$

в знаменателе: $(D_x)_1$ – доза биологически активного вещества, которая «изменяет систему» на $x\%$ (например, вызывает гибель клеток), и $(D_x)_2$ – доза физического фактора, которая «изменяет систему» на $x\%$ (рассчитываются по уравнению медианного эффекта); в числителе: $(D)_1$ и $(D)_2$ дозы биологически активного вещества (физического фактора)

в комбинации, которые «изменяют систему» на $x\%$. $CI < 1$ отражает синергизм, $CI = 1$ – аддитивный эффект, $CI > 1$ – антагонизм.

Получить график распределения комбинаторного индекса относительно уровня эффекта (f_a -CI plot) можно расположив CI по оси ординат, а уровень эффекта (f_a) по оси абсцисс. Крайние точки значений CI для синергизма составляют от 0 до 1; для антагонизма – от 1 до бесконечности. При построении графика f_a -log CI синергизм характеризуется отрицательными значениями, а антагонизм – положительными (при аддитивном эффекте $\log CI = \log 1 = 0$).

Одной из главных целей отбора синергических комбинаций является снижение дозы используемых биологически активных веществ (или физических факторов), при сохранении прежней эффективности. Индекс снижения дозы (*dose-reduction index* (DRI)) показывает, во сколько раз можно снизить дозу каждого компонента комбинации для получения эффекта, сравнимого с эффектом компонентов:

$$(DRI)_1 = \frac{(D_x)_1}{(D)_1} \quad (9)$$

Таким образом, благодаря работе Т. Chou и Р. Talalay была создана универсальная теория медианного эффекта с рядом вытекающих из нее теорем. На их основе могут быть построены алгоритмы компьютерного моделирования и анализа медико-биологических процессов.

Прикладные аспекты. На основании уравнения медианного эффекта и вытекающих из него следствий на кафедре фармакологии УО БГМУ разработан алгоритм анализа фармакодинамического взаимодействия биологически активных веществ и физических факторов в программной оболочке Excel [1]. Алгоритм представлен в таблице 1 в виде пошагового описания на примере изучения комбинации биологически активного вещества и физического фактора, обозначенных как А и В, соответственно.

Таблица 1. Интерактивный алгоритм анализа комбинированных воздействий по Chou-Talalay

Шаг п/п	Содержание операции
1	Выполнение эксперимента, первичная обработка и подготовка результатов (Для комбинации (А+В) и каждого из компонентов (А и В) рассчитываются показатели: f_a ; f_u (1- f_a); f_a/f_u ; $\lg(D)$; $\lg(f_a/f_u)$.)
2	Перенос данных ($\lg(D)$ и $\lg(f_a/f_u)$) в ППП «Statistica» и выполнение регрессионного анализа доза-эффект для комбинации (А+В) и каждого из компонентов (А и В), включая расчет – уравнения регрессии, – остаточного стандартного отклонения $\log [f_a/f_u]$, – стандартной ошибки коэффициента регрессии m (SE m), – стандартной ошибки коэффициента регрессии y_{int} (SE y_{int}), – коэффициента статистической взаимосвязи между коэффициентами регрессии m и y_{int} (CCSI).

Шаг п/п	Содержание операции
3	Расчет дозы (D) вещества, оказывающей определенный эффект (fa), по уравнению регрессии $\lg(fa/fu) = m \times \lg(D) + y_{int}$ для компонентов (A и B) при раздельном (индивидуальном) воздействии и для каждого в составе комбинации.
4	Расчет 95% доверительного интервала для $\lg D$ для компонентов (A и B) при раздельном (индивидуальном) воздействии и для каждого в составе комбинации.
5	Расчет стандартного отклонения D (SD_D) на разных уровнях эффекта (от 0,02 до 0,98 с шагом 0,02) для компонентов (A и B) при раздельном (индивидуальном) воздействии и для каждого в составе комбинации.
6	Расчет 95% доверительного интервала для линии регрессии ($\lg fa/fu$) для компонентов (A и B) при раздельном (индивидуальном) воздействии и для каждого в составе комбинации.
7	Расчет 95% доверительного интервала для области значений ($\lg fa/fu$) для компонентов (A и B) при раздельном (индивидуальном) воздействии и для каждого в составе комбинации.
8	Расчет комбинаторного индекса (CI) на разных уровнях эффекта (fa) (от 0,02 до 0,98 с шагом 0,02) с оценкой результата по авторской шкале.
9	Расчет 95% доверительного интервала комбинаторного индекса (CI) на разных уровнях эффекта (fa) (от 0,02 до 0,98 с шагом 0,02)
10	Расчет индекса снижения дозы (DRI) и $\lg DRI$ для вещества A и вещества (физического фактора) B при комбинированном применении на определенном уровне эффекта (fa).
11	Расчет 95% доверительного интервала для $\lg DRI$ и индекса снижения дозы (DRI) для вещества A и вещества (физического фактора) B при комбинированном применении на определенном уровне эффекта (fa).
12	Построение графиков распределения комбинаторного индекса (fa-CI-plot) и индекса снижения дозы (fa-DRI A-plot; fa-DRI B-plot).
13	Анализ результатов, заключение.

Примечание. D – доза или концентрация вещества/доза физического фактора; fa – фракция «затрунутая» (на которую повлияли) данной дозой или концентрацией вещества/дозой физического фактора; fu – «незатрунутая» фракция (на которую повлиять не удалось) данной дозой или концентрацией вещества/дозой физического фактора.

Алгоритм позволяет оценить взаимодействие не только качественно (рассчитать направленность), но количественно (оценить силу) в соответствии с разработанной авторами шкалой [2] (таблица 2). Полученные результаты можно представить графически, как это показано на рисунках 1 и 2.

Таблица 2. Шкала направленности и силы взаимодействий биологически активных веществ (физических факторов) по Chou-Talalay [2]

Диапазон CI	Описание	Диапазон CI	Описание
<0,10	Очень сильный синергизм	1,10–1,20	Слабый антагонизм
0,10–0,30	Сильный синергизм	1,20–1,45	Умеренный антагонизм
0,30–0,70	Синергизм	1,45–3,30	Антагонизм
0,70–0,85	Умеренный синергизм	3,30–10,00	Сильный антагонизм
0,85–0,90	Слабый синергизм	>10,00	Очень сильный антагонизм
0,90–1,10	Аддитивный эффект		

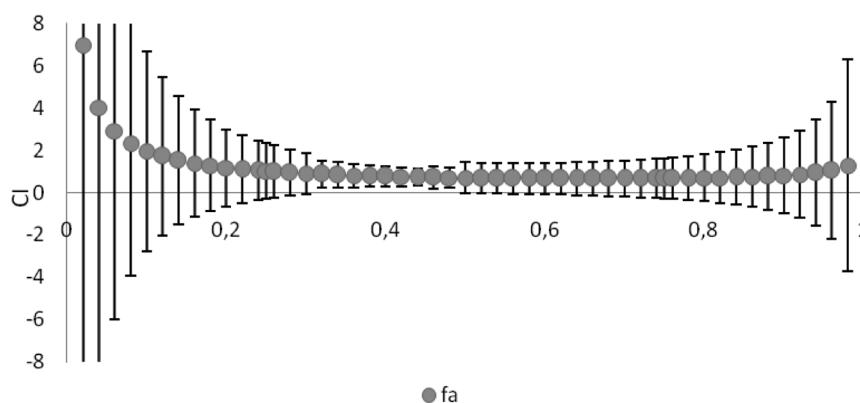


Рис. 1. Распределение комбинаторного индекса CI (fa-CI-plot) (на диаграмме указан 95% доверительный интервал CI)

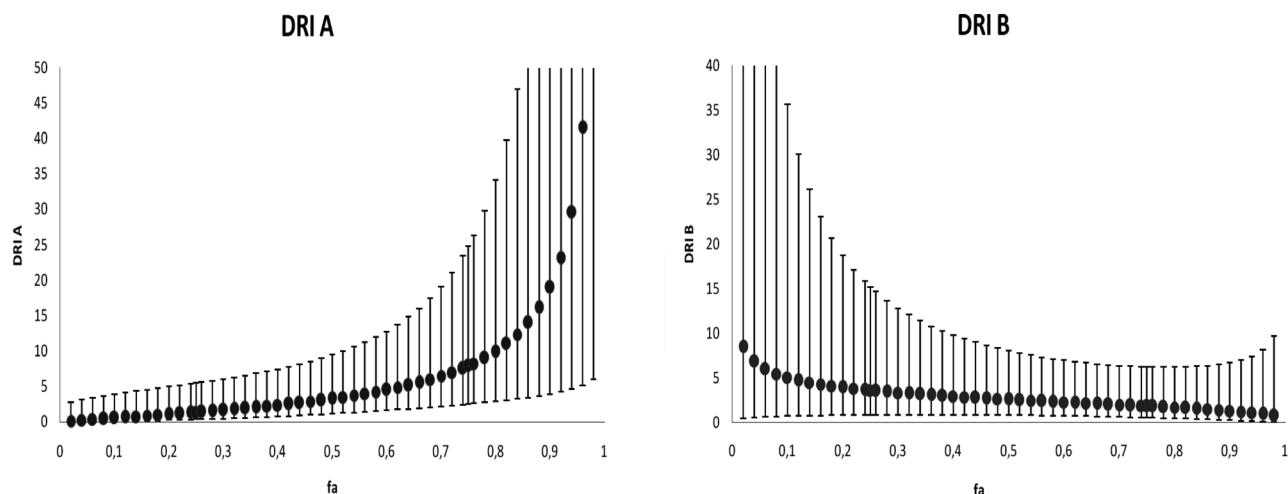


Рис. 2. Распределение индекса снижения дозы (DRI) для вещества А (fa-DRI A-plot) и физического фактора В (fa-DRI B-plot) (на диаграмме указан 95% доверительный интервал; шкала логарифмическая)

Выводы

1. Анализ мирового опыта в области комбинаторной фармакологии показывает, что одним из наиболее обоснованных подходов к оценке фармакодинамических взаимодействий лекарственных средств (других биологически активных веществ или физических факторов) является практическое приложение детально разработанной и широко апробированной «универсальной» теории Chou-Talalay и её теоремы комбинаторного индекса.

2. Разработанный алгоритм изучения и анализа комбинированных воздействий по Chou-Talalay [1] позволяет быстро рассчитать направленность и силу фармакодинамических взаимодействий по значению комбинаторного индекса (CI), а также установить индекс снижения дозы (DRI) для каждого компонента комбинации. Алгоритм позволяет анализировать комбинации различного качественного и количественного состава, рассчитывать результат взаимодействия на любом уровне фармакологического (токсического) эффекта при любой желаемой вероятности безошибочного прогноза.

3. Разработанный продукт может быть использован в научных лабораториях, занимающихся проблемами комбинированного воздействия ксенобиотиков на биологические системы любого уровня организации. Использование алгоритма позволяет разрабатывать рекомендации по рациональному применению и дозированию комбина-

ций лекарственных средств в клинической практике, а также оценивать перспективность разработки новых комбинированных лечебных технологий. Разработанный продукт не имеет аналогов в Республике Беларусь.

Литература

1. Бизунок, Н. А. Интерактивный алгоритм анализа комбинированного воздействия химических веществ (ксенобиотиков) и физических факторов в эксперименте / Н. А. Бизунок, А. В. Гайдук, Б. В. Дубовик // УО БГМУ. – Удостоверение на рационализаторское предложение № 11/2014 от 18.05.2014 г.
2. Chou, T-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies / T-Ch. Chou // Pharmacological reviews. – 2006. – Vol. 58. – P. 621–681.
3. Chou, T. Ch. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method / T-Ch. Chou // Cancer Res. – 2010. – Vol. 70, N 2. – P. 440–446.
4. Copenhaver, T. W. Joint drug action: a review / T. W. Copenhaver, T. L. Lin, K. M. Goldberg // American Statistical Association, Proceedings of the Biopharmaceutical Section. – 1987. – P. 160–164.
5. Greco, W. R. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. / W. R. Greco, G. Bravo, J. C. Parsons // Pharmacol Rev. – 1995. – Vol. 47. – P. 331–385.
6. Tallarida, R. J. Quantitative methods for assessing drug synergism / R. J. Tallarida // Genes Cancer. – 2011. – N 11. – P. 1003–1008.

Поступила 14.07.2015 г.